



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Síntesis de Nanopartículas de Oro y Plata para su
aplicación en Terapias Alternativas de Cáncer: Terapia
Fotodinámica y Terapia Fototérmica***

Tesista: Lic. María Belén Rivas Aiello

Director: Daniel O. Mártire

Co-Director: Peter R. Ogilby

Año: 2018



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

Síntesis de Nanopartículas de Oro y Plata para su aplicación en Terapias Alternativas de Cáncer: Terapia Fotodinámica y Terapia Fototérmica.

Trabajo de Tesis Doctoral

Licenciada María Belén Rivas Aiello

Director: Dr. Daniel O. Mártire



La Plata, Argentina. 2018.

El presente trabajo de tesis, para acceder al grado académico de Doctora en Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Prof. Dr. Daniel O. Mártire.

Licenciada María Belén Rivas Aiello

E-mail: belen.rivasaiello@gmail.com.ar

***“Para aquellos que luchan por tenerlo,
y cuando lo tienen, lo cuidan y lo aman,
como si no quisieran perderlo nunca.”***

Miguel Gane

***A María, que nunca dejó de acompañarme.
A Gero, el gran amor de mi vida.
A Vale, mi eterna compañera.
A Sil y Edu, mi apoyo infinito.***

Índice

Agradecimientos	1
Símbolos y Abreviaturas	5
Introducción.....	9
Generalidades sobre el Cáncer	10
Mecanismos de muerte celular	12
Terapia Fotodinámica	13
Terapia Fotodinámica y Nanotecnología	14
La Riboflavina como fotosensibilizador	15
Terapia Fototérmica.....	19
Terapia Fototérmica y Nanotecnología.....	20
Bibliografía	22
Objetivos	24
Objetivo General	25
Objetivos Específicos	25
Materiales y Métodos	26
Materiales	28
Métodos.....	30
Espectroscopía UV-Visible.....	30
Microscopía de transmisión electrónica (TEM)	30
Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).....	30
Medidas de Potencial Z	31
Espectroscopías de Emisión	31
Medidas de Fluorescencia en Estado Estacionario	31
Medidas de Fluorescencia Resueltas en el tiempo	31
Espectroscopía de absorción UV-visible de transientes resuelta en el tiempo.....	31

Láser Flash Fotólisis	32
Experimentos de Pump-Probe.....	32
Detección de especies reactivas de oxígeno.....	34
Detección por fosforescencia oxígeno singlete	34
Medidas de consumo de oxígeno mediante el uso de electrodo sensible a oxígeno molecular	35
Medidas de cuantificación de agua oxigenada (H ₂ O ₂)	35
Cultivo Celular	36
Citotoxicidad Celular	36
Ensayo de Reducción de MTT	36
Ensayo de Captación de Rojo Neutro	37
Microscopía confocal de disco giratorio (Spinning Disk)	37
Medidas de Microscopía de tiempos de vida de imagen de fluorescencia (FLIM).....	38
Microscopía FTIR con radiación sincrotrón.....	41
Análisis de componentes principales	42
Espectroscopía de fotoacústica resuelta en el tiempo	44
Actinometría	45
Equipamiento menor	47
Bibliografía	48

Capítulo 1: Efecto de Nanopartículas de Plata estabilizadas con Pectina en la fotofísica de la Riboflavina

Introducción	52
Síntesis de las PecAgNP	53
Caracterización de las PecAgNP	53
Interacción de las PecAgNP con la Riboflavina en estado basal	56
Efecto de las PecAgNP en la fluorescencia de la Riboflavina.....	58
Experimentos de Pump-Probe	60

Experimentos de Láser Flash Fotólisis.....	64
LFP con $\lambda^{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$	64
LFP con $\lambda^{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$	68
Efecto de las PecAgNP en la generación de ROS por parte de la RF.....	71
Conclusiones Parciales	75
Bibliografía	76
 Capítulo 2: Aplicación de las PecAgNP en PDT	80
Introducción	81
Ingreso de la Riboflavina en las células	83
Ensayos de citotoxicidad en células HeLa	83
Ensayos de Anexina V y PI	87
Microespectroscopía SR-FTIR	89
Conclusiones Parciales	95
Bibliografía.....	96
 Capítulo 3: Efecto de nanopartículas de oro estabilizadas con pectina en la fotofísica de la Riboflavina	99
Introducción	100
Síntesis de las PecAuNP.....	101
Caracterización de las PecAuNP.....	101
Interacción de las PecAuNP con la Riboflavina en estado basal.....	103
Efecto de las PecAuNP en la fluorescencia de la Riboflavina.....	104
Experimentos de Láser Flash Fotólisis.....	105
Efecto de las PecAuNP en la generación de ROS por parte de la RF	110
Conclusiones parciales	112
Bibliografía	113

<u>Capítulo 4:</u> Síntesis y caracterización de Nanoplatos de Plata. Estudio de sus propiedades fotofísicas.	115
Introducción	116
Síntesis de los Nanoplatos.....	117
Caracterización de los Nanoplatos.....	117
Medidas de incremento de temperatura	121
Ensayos de optoacústica	121
Medidas de Fosforescencia de Oxígeno singlete	123
Conclusiones Parciales	125
Bibliografía	126
 <u>Capítulo 5:</u> Aplicación de los Nanoplatos de Plata en PTT	128
Introducción	130
Ensayos de MTT y RN	131
Ensayos de Anexina V y PI	132
Ensayos de co-localización de la RhB	133
Evaluación de la RhB como termómetro óptico intracelular.....	135
Experimentos de microscopía de tiempos de vida de fluorescencia (FLIM)	140
Conclusiones Parciales	148
Bibliografía.....	149
 <u>Capítulo 6:</u> Conclusiones Generales	152



Agradecimientos

“Me niego a vivir en el mundo ordinario como una mujer ordinaria. A establecer relaciones ordinarias. Necesito el éxtasis. Soy una neurótica, en el sentido de que vivo en mi mundo. No me adaptaré de mi mundo. Me adapto a mí misma.”

Anaïs Nin

El hecho de que hoy pueda estar presentando este trabajo de tesis, no es solo consecuencia de un esfuerzo personal del cual me siento totalmente orgullosa, sino que también (y en mayor medida) es fruto de la ayuda y el apoyo de muchas personas a las cuales les debo mi más sincero y profundo agradecimiento.

En primer lugar, quiero agradecer al ideólogo de este trabajo, mi director Dani, por su ayuda y comprensión en todo sentido. Por depositar su confianza en alguien que no conocía, alentarme en mis ideas, animarme a seguir avanzando y orientarme cuando no sabía para que lado seguir y entraba en crisis. Por ser un jefe siempre dispuesto a aconsejarme, no sólo a nivel académico, sino también a nivel personal. Durante todo este tiempo hubo cosas que me costaron mucho, y él nunca dudo en darme su apoyo priorizando lo humano antes que lo académico; sé que soy de las pocas personas que tienen la suerte de encontrarse con alguien así en un mundo que a veces suele ser un poco cruel.

A Mónica, no solo por su incondicional apoyo por ser la otra cabeza de este grupo, sino también, y sobre todas las cosas, por su apoyo como mujer y sus consejos en momentos personales difíciles, en los cuáles todo para mí era caos y con unas pocas palabras logró iluminarme el camino.

A todos los miembros del eterno LEAR, con los cuales nos seguimos resistiendo a ser grupos separados. Durante estos 5 años hubo mucho movimiento de gente y a todos les debo un enorme agradecimiento.

A mis “papás” del grupo y grandes amigos ML y Cris, por tanto cariño; a Gaby, por su enorme ayuda todos estos años; a Vale y Hernán.

A todos los chicos de la ofi, pasados y presentes: JJR, Fabio, Laurita, Francha, Dami, Flor, Dario, Lu, Bruno, Darlin, Emi, Quitilau, el Colo, por horas y horas de mates, los premios dulces, los chocolates después de los viajes, las salidas y los afters dentro y fuera de la ofi. Un agradecimiento muy especial a los que son mis amigos fuera del 107N, con los que compartí momentos que son y serán inolvidables.

A los chicos del IMBICE, Juli y Dani, no solo por su ayuda y paciencia en los experimentos biológicos, sino también por los mates, las charlas y los consejos.

A Pedro, por ayudarme con las medidas en el CIOP.

A Julio, por tanta paciencia con las medidas de TEM.

A Seba, por los análisis de SR-FTIR.

A toda la gente que conocí gracias a la Cátedra de Intro y General, sobre todo a Caro, Silvana, Emi, Sil y Lau, por los mediodías de picada y alguna que otra cerveza o trago en horarios extraños, por haber estado siempre a mi lado aconsejándome.

A toda la gente del primer piso y de la casita del INIFTA, por las charlas entre pasillos, las reuniones primaverales, de fin de año, de principio de año, las salidas en los congresos y tantos otros momentos compartidos.

A Peter R. Ogilby y todos los miembros del Center of Oxygen Microscopy Imaging (COMI) por su ayuda durante mi estadía en la Universidad de Aarhus, Dinamarca.

A Christophe Sandt, miembro de la línea SMIS, por su ayuda durante mi estadía en el sincrotrón SOLEIL, Francia.

A las instituciones que permitieron el desarrollo de este trabajo. Principalmente el INIFTA, mi lugar de trabajo durante todos estos años; y a la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, por formarme con una educación de calidad durante estos 10 años y continuar defendiendo la educación pública. Agradezco también a las otras dos instituciones que financiaron este trabajo: CONICET y Agencia.

A mis amigos de toda la vida, los Meduseros, Jose, Ceci y Anto, esas personas que más que amigos son como hermanos. Por las despedidas de cada viaje que me presentaba este trabajo. Por ayudarme a tirar para adelante en cada momento de mi vida. Por las salidas y los miles de minutos de charlas. Por cada momento compartido, por una vida juntos.

A mis sobrinos del corazón: Bauti, Valen, Marti y Genarito que me tienen loca de amor.

A mis amigos de exactas. Especialmente a Carin y a Florcita que a pesar de la distancia que terminar la carrera genera, siguieron estando siempre a mi lado de una u otra forma. Y a Flafi, por su incondicional amistad y apoyo durante todo este último tiempo, por compartir mis mismas locuras.

A mi familia, que sin dudar es lo más importante que tengo.

A Tuli que, si bien lo acepté medio a la fuerza y un poco descolocada cuando volví del viaje de Dinamarca, se convirtió en mi gran amigo, confidente y consejero.

Mis viejos, los famosos Sil y Edu que todo el mundo pregunta quienes son cuando hablamos por teléfono, las dos personas que me sostienen cada segundo de mi vida, los que nunca dejaron de creer de lo que yo era capaz, incluso cuando yo misma perdía la confianza en mí, los que se esforzaron desde que nací para que logré cumplir todas mis metas y mis sueños.

A Vale, mi feita, mi compañera de vida, la hermana que me toco y que sin duda elegiría si tuviera la posibilidad de hacerlo, mi modelo a seguir siempre, la persona que, a pesar de nuestras diferencias, nunca me va a dejar sola, porque el amor que tenemos es único.

Y por último a Gero, mi sobrino, que, con su llegada, su amor incondicional y su inocencia nos cambió la vida a todos. Porque sin saberlo, es la persona que más me tira para seguir adelante cuando las cosas se ponen difíciles, pero sobre todo porque con él conocí el amor más puro y maravilloso que experimenté en mi vida.

Gracias a todos.

Bel

La Plata, 21 de noviembre del 2018.



Símbolos y Abreviaturas

***“Me gustan las personas simples porque tienen la sabiduría de aquel que no carga el peso innecesario de las cosas, y alimenta su alma de todo lo vivido.
Me gustan aquellos pocos que no son lo que poseen, sino lo que dan.
Me gustan los locos que tienen el coraje de vivir la vida, como si nunca los fuera a alcanzar la muerte”***

Lucas Hugo Guerra

(λ^{em})	Longitud de Onda de Emisión
(λ^{exc})	Longitud de Onda de Excitación
(ϕ_T)	Rendimiento Cuántico de Generación del Triplete
($\Delta E_{0,0}$)	Energía del Estado Triplete
($\Delta_{ET}G^\circ$)	Cambio de Energía Estándar de Gibbs
($^1Rf^*$)	Estado Singlete Excitado de la riboflavina
($^3Rf^*$)	Estado Triplete Excitado de la riboflavina
(AlPcS₄)	Ftalocianina de Aluminio
(ATR)	Reflectancia Total Atenuada
(D₂O)	Agua Deuterada
(DADS)	Espectros Diferencia Asociados al Decaimiento
(E°)	Potencial Redox
(EADS)	Espectros Diferencia Asociados a la Evolución
(FAD)	Dinucleótido de Flavina y Adenina
(FBS)	Suero Fetal Bovino
(FLIM)	Microscopía de Tiempos de Vida de Imagen de Fluorescencia
(FRET)	Transferencia de Energía de Resonancia de Förster
(FTIR)	Microespectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier
(H₂O₂)	Peróxido de Hidrógeno
(<i>k</i>)	Constante de Velocidad de Reacción
(LFP)	Láser Flash Fotólisis
(LSPR)	Resonancia Localizada Por Plasmones Superficiales
(MC)	Muerte Celular
(MEM)	Medio Eagle Modificado
(MEP)	Fosforescencia Aumentada Por Metales
(MTT)	Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico
(NADH)	Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina
(NIR)	Infrarrojo Cercano
(NP1)	Nanoplatos de Plata recubiertos de PVP

(NP2)	Nanoplatos de Plata recubiertos de PVP (otros)
(NP3)	Nanoplatos de Plata recubiertos de PEG
(RN)	Rojo Neutro
(O₂(¹Δ_g))	Oxígeno Singlete
(O₂^{•-})	Radical Anión Superóxido
(OH[•])	Radical Hidroxilo
(PC1)	Primer Componente Principal
(PC2)	Segundo Componente Principal
(PC3)	Tercer Componente Principal
(PCA)	Análisis de Componentes Principales
(PDT)	Terapia Fotodinámica
(PecAgNP)	Nanopartículas de Plata estabilizadas con Pectina
(PecAuNP)	Nanopartículas de Oro estabilizadas con Pectina
(PEG)	Polietilenglicol
(PI)	Yoduro de Propidio
(PMT)	Fotomultiplicador
(PTT)	Terapia Fototérmica
(PVP)	Polivinilpirrolidona
(Rf)	riboflavina
(Rf^{•-})	Radical Anión de la riboflavina
(Rf^{•+})	Radical Cation de la riboflavina
(RfH[•])	Radical Neutro de la riboflavina
(RfH₂)	Especie Totalmente Reducida de la riboflavina
(RhB)	Rodamina B
(ROS)	Especies Reactivas de Oxígeno
(S₀)	Estado Basal
(S₁)	Estado Excitado Singlete
(SR)	Radiación Sincrotrón
(T₁)	Estado Excitado Triplete
(TAS)	Espectroscopía de Absorción de los Transientes

(TCSPC)	Recuento de Fotones Individuales Correlacionados en el Tiempo
(TEM)	Microscopía Electrónica de Transmisión
(TMPyP)	Tetraquis(4-N-metilpiridil) porfirina
(TPPCOOMe)	Tetrafenilporfirina-metil-éster
(τ)	Tiempo de Vida de Fluorescencia



Introducción

“Creo en el poder de la risa y las lágrimas como un antídoto para el odio y el terror”

Charles Chaplin

Generalidades sobre el cáncer

Se llama cáncer a un conjunto de enfermedades relacionadas que se desencadenan como resultado de una división celular desprogramada. La división celular está regulada por varios factores de crecimiento extracelulares; defectos en la síntesis, regulación o reconocimiento de los mismos, pueden originar esta enfermedad (1). La mayoría de estos defectos se deben principalmente a daños en dos tipos principales de genes (1):

- Protooncogenes: Codifican para proteínas reguladoras del crecimiento celular. Mutaciones en los mismos, los convierten en oncogenes, haciéndolos excesivamente activos en la promoción del crecimiento.
- Genes supresores de tumores: Codifican para proteínas que restringen la división celular, por lo que una mutación en estos genes lleva a un crecimiento inapropiado.

Ambos tipos de genes suelen codificar para proteínas que intervienen en la regulación del crecimiento celular, en la muerte celular mediante apoptosis o en la codificación de proteínas que participan en la reparación del ADN(2).

Es poco común que mutaciones en un solo gen conduzcan a la aparición de cáncer. Suelen ser una serie de mutaciones en múltiples genes las que crean un tipo celular que prolifera de modo progresivo, escapando de los mecanismos de regulación del crecimiento y generando un aumento en la probabilidad de generar mutaciones adicionales. Las células cancerosas proliferan sin la necesidad de una señal inductora externa, no son capaces de restringir la división y continúan viviendo cuando deberían morir. A menudo cambian su capacidad de adhesión a las células circundantes o a la matriz extracelular y se sueltan para dividirse con mayor velocidad. Finalmente, este clon de células crece y forma lo que conocemos como tumor. Los tumores pueden clasificarse de la siguiente manera:

- Benignos: Suelen estar localizados y son de tamaño pequeño. Sus células son semejantes a las células normales y pueden funcionar como ellas. Las moléculas de adhesión celular los mantienen localizados en los tejidos donde se originaron.
- Malignos: Sus células crecen y se dividen más rápido que las células normales y no mueren en el tiempo previsto. Son capaces de invadir nuevos tejidos.

Una vez formados los tumores para alcanzar cierto tamaño necesitan obtener irrigación sanguínea y suelen conseguirla por medio del crecimiento de vasos, procedimiento conocido como angiogénesis. La angiogénesis a su vez, facilita el proceso

de metástasis, el cual ocurre cuando células del tumor primario logran migrar hacia nuevos sitios donde producen nuevos tumores conocidos como tumores secundarios (2).

Los tratamientos más comunes incluyen cirugía, quimioterapia y radiación. La cirugía suele ser altamente efectiva en tumores primarios, pero se encuentra limitada solo a tumores que sean accesibles quirúrgicamente, y por lo general, siempre deja restos de células cancerosas. La quimioterapia consiste en el uso de drogas químicas, que son administradas sistemáticamente y atacan a todas las células que se dividan rápidamente; es por esa razón que tiene una gran cantidad de efectos secundarios. La radiación utiliza partículas ionizadas de alta energía para dañar células y tejidos a nivel molecular; suele utilizarse como tratamiento complementario luego de una cirugía para erradicar las células cancerosas que puedan quedar (3).

A continuación, se describirán dos temas principales:

- 1) Los mecanismos existentes de muerte celular.
- 2) Dos de las terapias alternativas que se encuentran en continuo desarrollo para el tratamiento del cáncer: la terapia fotodinámica y la fototérmica. Este trabajo de tesis apunta a mejorar mediante el uso de nanomateriales metálicos a ambas terapias.

Mecanismos de Muerte Celular

La muerte celular (MC) es parte del proceso de desarrollo normal y del ciclo de maduración celular, así como también un proceso muy importante en la prevención y el desarrollo de terapias contra el cáncer (4).

La MC puede ocurrir principalmente de tres maneras diferentes (5):

- **Apoptosis:** La apoptosis es un proceso de muerte celular programado y controlado.
Este proceso, puede ser provocado por señales externas, que actúan sobre receptores de la membrana plasmática, o por acontecimientos internos en la célula, como, por ejemplo, infecciones víricas. Cuando una célula recibe una señal para la apoptosis, se desencadenan una serie de eventos que liberan ciertas enzimas proteolíticas encargadas de la degradación de proteínas (1).
Se caracteriza por cambios morfológicos y bioquímicos específicos, como lo son la contracción celular, la condensación y fragmentación nuclear, la formación de vacuolas en la membrana y la pérdida de adhesión a las células vecinas o a la matriz extracelular (6). Los cambios bioquímicos incluyen la ruptura del ADN cromosómico en varios fragmentos, la fosforilación de fosfatidilserina y la ruptura de varios sustratos intracelulares mediante enzimas proteolíticas (7,8).
- **Autofagia:** La autofagia es un proceso catabólico que comienza con la formación de estructuras de doble membrana, conocidas como autofagosomas, los cuales se unen a distintas macromoléculas y orgánulos destinados al reciclaje (9,10).
La autofagia suele jugar un papel fundamental para poder mantener la homeostasis celular en períodos de inanición o estrés, y de esta forma conservar las células con vida (11). A pesar de esto, existe evidencia de que las células autofágicas, frente a situaciones de estrés excesivo, pueden desencadenar un proceso de muerte celular (12).
- **Necrosis:** La necrosis, implica inflamación de las células, pérdida de función de las organelas y finalmente la lisis celular (13,14). Cuando las células se someten a la muerte celular de esta manera, la integridad de la membrana celular se interrumpe de modo que los materiales intracelulares se liberan en el medio extracelular, lo que conduce a respuestas inflamatorias por parte de las células del sistema inmune (15).

Terapia Fotodinámica

Los primeros indicios de los efectos citotóxicos de la luz y los colorantes datan de principios del siglo XIX, cuando se observó que paramecios expuestos al colorante eosina dejaban de moverse en habitaciones muy iluminadas. Pero no fue hasta 1950 que se descubrió que algunos colorantes tenían mayor afinidad por tejidos neoplásicos y podían ser utilizados para el tratamiento de tumores y enfermedades de la piel (16).

La terapia fotodinámica (PDT, del inglés: photodynamic therapy) está basada en la inducción de la muerte celular por combinación de dos factores principales: luz y oxígeno. El tratamiento consiste en la utilización de un fotosensibilizador que es expuesto a luz de longitud de onda adecuada, llevando al fotosensibilizador a un estado excitado, el cual interacciona con el oxígeno molecular generando oxígeno singlete y otras especies reactivas de oxígeno. Estas especies, desencadenan una serie de cambios bioquímicos que conducen a la muerte celular (17).

Las principales ventajas de la PDT con respecto a otras terapias utilizadas contra el cáncer son (17):

- La baja citotoxicidad de las drogas utilizadas, ya que solo son activadas en presencia de luz.
- La selectividad del tratamiento, ya que puede irradiarse solo la zona deseada.
- La capacidad de combinarse con otras terapias para mejorar el tratamiento.

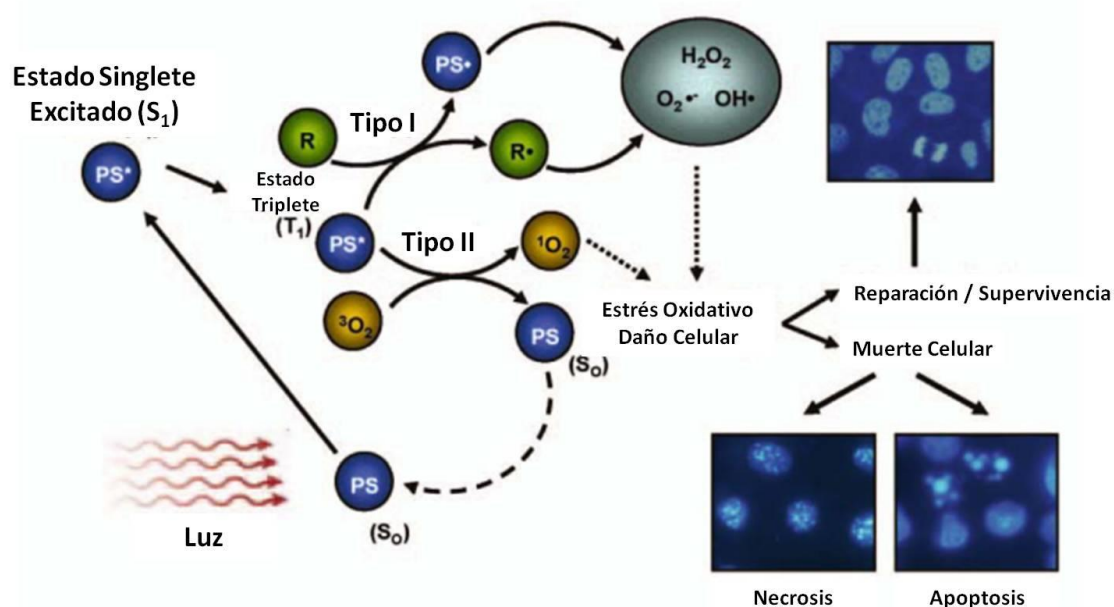


Figura 1: Mecanismo por el cual ocurre la muerte por PDT. Adaptado de (17).

En la terapia fotodinámica, luego de la absorción de un fotón al ser irradiado con luz, el fotosensibilizador pasa de un estado basal (S_0), a un estado excitado singlete (S_1), el cual, mediante un proceso conocido como cruce entre sistemas, forma un estado triplete electrónicamente excitado (T_1). Este estado triplete puede seguir dos caminos útiles desde el punto de vista de la PDT(18):

- Reacciones del Tipo I: El estado T_1 interactúa directamente con biomoléculas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos) dentro de la célula mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno o un electrón. De esta manera se forman radicales y iones radicales los cuales al reaccionar con oxígeno molecular generan productos oxigenados como el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).
- Reacciones tipo II: El estado T_1 transfiere su energía directamente al oxígeno para formar oxígeno singlete ($O_2(^1\Delta_g)$), una especie altamente oxidante.

Este conjunto de especies derivadas del oxígeno molecular: $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2 y $O_2(^1\Delta_g)$, conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés: reactive oxygen species), son las encargadas de generar el estrés oxidativo que desencadenará el proceso de muerte celular deseado en la terapia fotodinámica.

Terapia fotodinámica y nanotecnología

La nanotecnología es una de las tecnologías emergentes más utilizadas para mejorar la eficiencia de la PDT. Las nanopartículas, se definen como partículas con una dimensión submicroscópica entre 1 y 100 nm (19). Existen varios tipos y mecanismos en que las nanopartículas pueden colaborar en este sentido (20):

- Nano-transportadores: son nanopartículas de diversa naturaleza, que tienen como objetivo el traslado más eficiente del fotosensibilizador a la zona en la que el mismo debería actuar. De esta manera, disminuye la cantidad de fotosensibilizador necesaria para lograr el efecto fototóxico. Además, logrando utilizar menor cantidad de fotosensibilizador, se reducen los efectos secundarios de la terapia.
- Nanopartículas fotosensibilizadoras: Por lo general se trata de nanopartículas de pequeño tamaño conocidas como puntos cuánticos, los cuales pueden transferir energía al oxígeno molecular, generar oxígeno singlete y producir citotoxicidad, sin la necesidad de que haya un fotosensibilizador orgánico en el medio. Entre ellas encontramos los fulerenos, partículas de óxido de titanio y partículas de óxido de cinc (19).
- Nanopartículas que aumentan el rendimiento de producción de especies reactivas de los fotosensibilizadores: Un mecanismo utilizado para lograr este efecto es el aumento en la producción de oxígeno singlete mediado por nanopartículas metálicas.

Particularmente en este trabajo de tesis, nos centraremos en este último punto.

Las nanopartículas metálicas tienen la particularidad de tener un efecto fotofísico que se conoce como resonancia localizada por plasmones superficiales (LSPR, del inglés: localized surface plasmon resonance), resultado de la interacción de las partículas con la luz. Al absorber las nanopartículas luz resonante, los electrones libres del metal oscilan de forma coherente alrededor de la superficie, fenómeno llamado resonancia superficial del plasmón (3).

El fenómeno de fosforescencia aumentada por metales (MEP, del inglés: metal enhanced phosphorescence) consiste en un acoplamiento plasmónico que da lugar a una transferencia de energía no radiativa entre los estados excitados del fotosensibilizador y los plasmones superficiales de las nanopartículas metálicas, llevando a un aumento de la población del estado triplete del fotosensibilizador (21,22). Un aumento en esta población resulta en una mayor producción de especies reactivas de oxígeno.

La Riboflavina como fotosensibilizador

La riboflavina (Rf), conocida también como Vitamina B2, es una vitamina soluble en agua presente en una gran cantidad de alimentos de consumo diario: leche, carne, frutas y vegetales (23). Pertenece al grupo prostético de la gran mayoría de las flavoproteínas, enzimas encargadas de catalizar la transferencia de electrones en el cuerpo humano (24). Su estructura se muestra en la Figura 2.

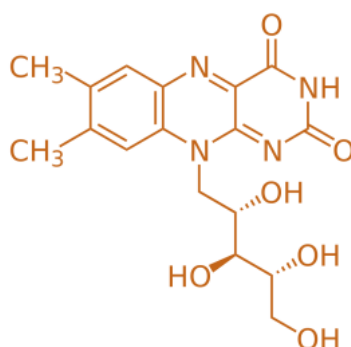


Figura 2: Estructura de la riboflavina.

La riboflavina es capaz de participar en procesos de transferencia electrónica tanto de uno como de dos electrones, lo que significa que puede existir en tres estados de oxidación diferentes: oxidada, semiquinona o totalmente reducida. En solución, los equilibrios entre las diferentes especies son dependientes del pH.

La riboflavina, de color amarillo-anaranjado, posee en su estado basal una fuerte absorción en la región ultravioleta y visible del espectro, teniendo cuatro máximos característicos a 220, 265, 375 y 445 nm, como se muestra en la Figura 3.

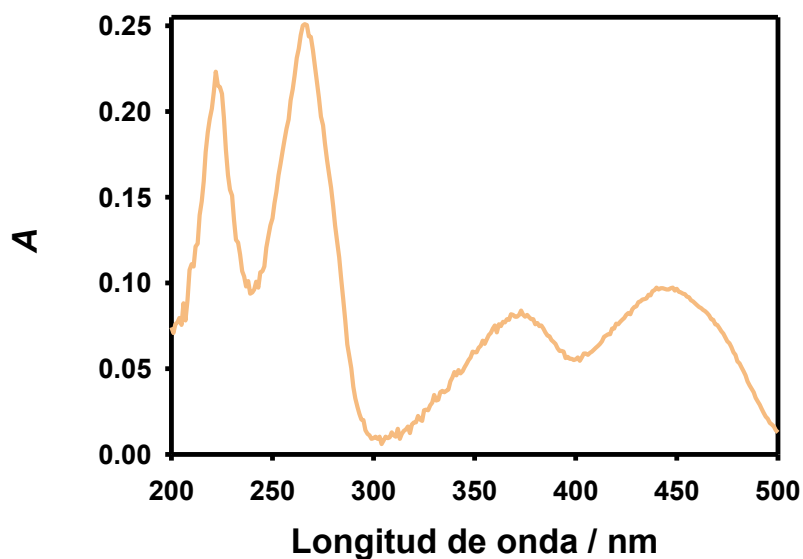


Figura 3: Espectro de absorción UV-Visible con esfera integradora de una solución de riboflavina 0.5 μ M en solución acuosa a pH 6.7.

Presenta además, al ser excitada con luz UV o UV-Visible, una fluorescencia intensa de color amarillo-verdoso con un máximo a 520 nm y un tiempo de vida de alrededor de 7.9 ns, dado por el decaimiento radiativo del estado singlete excitado ($^1R_f^*$, ver reacción (2) en la Figura 4) (24).

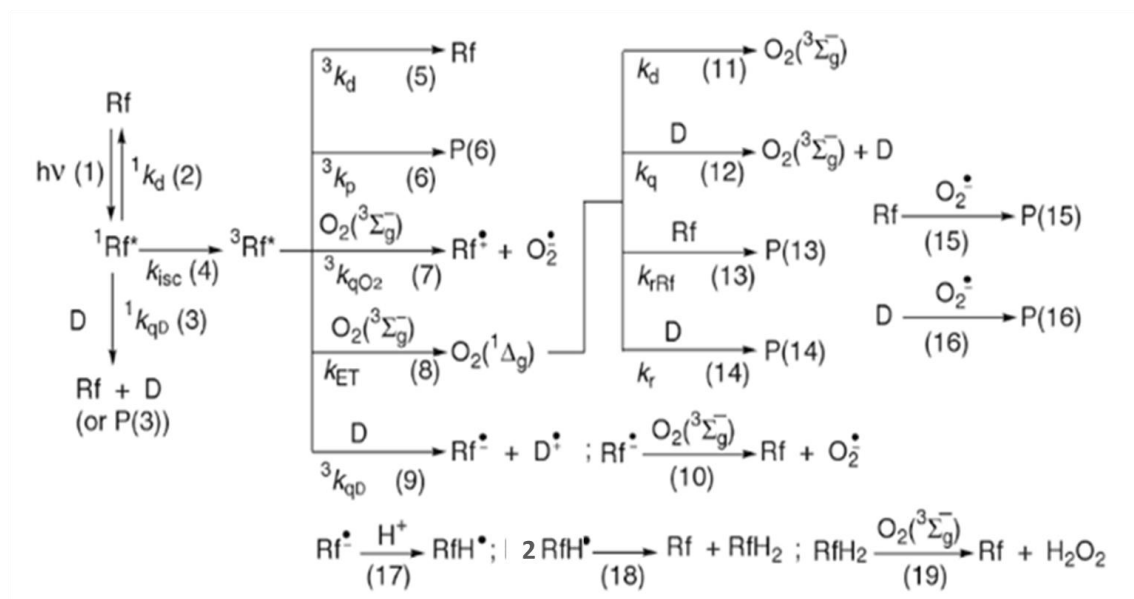


Figura 4: Posibles interacciones de la Rf en presencia de luz y sustratos (25).

El estado ${}^1Rf^*$, puede decaer (de forma radiativa o no radiativa) al estado basal Rf (proceso 2 en la Figura 4), puede ser desactivado por un sustrato presente en solución D (proceso 3), o generar mediante un cruce entre sistemas, con un rendimiento cuántico de 0.67, un estado triplete excitado (${}^3Rf^*$, proceso 4), el cual tiene un tiempo de vida de aproximadamente 15 μ s en condiciones anaeróbicas (25).

El estado ${}^3Rf^*$ puede decaer al estado basal Rf (proceso 5), generar productos P (proceso 6), reaccionar con el oxígeno molecular ($O_2({}^3\Sigma_g^-)$) para formar $O_2^{\bullet-}$ (con un rendimiento cuántico de 0.009 (26)) y el radical catión, $Rf^{\bullet+}$, por transferencia de electrones (reacción 7), u oxígeno singlete ($O_2({}^1\Delta_g)$) por transferencia de energía (con un rendimiento cuántico de 0.54) (24), proceso 8), o puede aceptar un electrón de un sustrato D, generando el radical anión de la riboflavina ($Rf^{\bullet-}$, reacción 9). $Rf^{\bullet-}$ puede también generar $O_2^{\bullet-}$ por una transferencia de electrones al oxígeno molecular (reacción 10). Por otro lado, el oxígeno singlete puede ser quencheado físicamente por el medio (proceso 11) o por el sustrato (proceso 12) para volver a dar $O_2({}^3\Sigma_g^-)$, o puede reaccionar con Rf (reacción 13) o el sustrato D (reacción 14) para dar productos oxidados. El $O_2^{\bullet-}$ generado también puede reaccionar con Rf (reacción 15) o con el sustrato D (reacción 16) generando productos de reacción (25).

Por último, en presencia de una especie capaz de donar protones, $Rf^{\bullet-}$ puede formar el radical neutro de la Rf (RfH^{\bullet}), el cual por recombinación (reacción 18) genera Rf y su especie totalmente reducida (RfH_2), que en presencia de oxígeno, puede oxidarse nuevamente dando Rf y agua oxigenada (H_2O_2) (25). Un esquema simplificado de estas reacciones se muestra en la Figura 4.

Cabe destacar también, que en soluciones acuosas, por aniquilación triplete-triplete, es posible la formación de dos especies en estado basal: el radical anión ($\text{Rf}^{\cdot-}$) y el radical catión ($\text{Rf}^{\cdot+}$) (27).

El estado triplete de la riboflavina es un oxidante muy fuerte, lo que permite la oxidación directa de la mayoría de las biomoléculas: lípidos, aminoácidos y proteínas. Puede interaccionar entonces con componentes celulares (llamados Sub en la Figura 5) por un mecanismo Tipo I, en el cual el estado triplete de la riboflavina es capaz de transferir un electrón o un hidrógeno, iniciando un proceso radicalario que culmina en la generación de especies reactivas de oxígeno: $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y $\cdot\text{OH}$ (24). Además, puede actuar mediante un mecanismo Tipo II, en el cual el estado triplete de la Rf transfiere su energía de excitación al oxígeno molecular generando así oxígeno singlete, con un rendimiento cuántico de 0.54 (28). Un resumen de ambos mecanismos se muestra en la Figura 5:

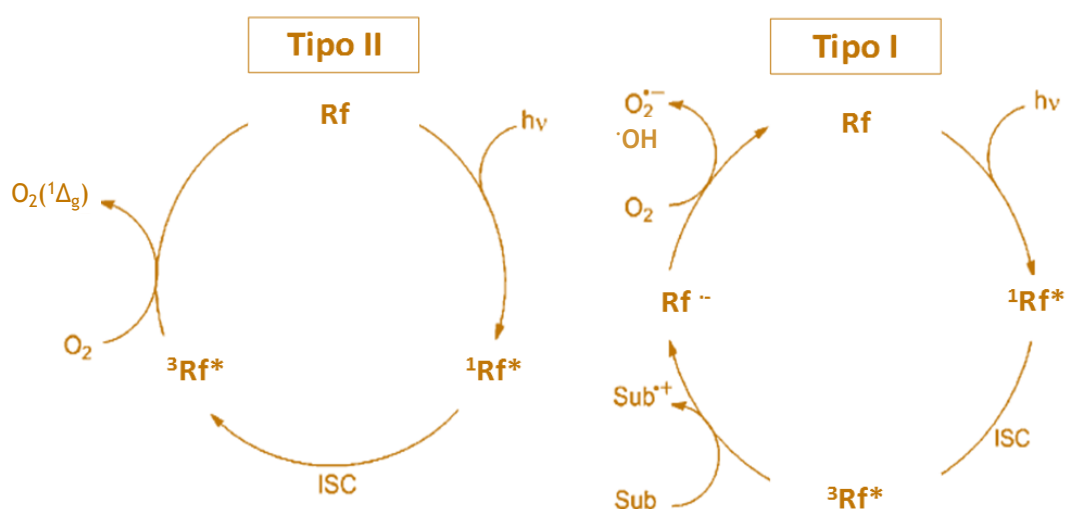


Figura 5: Mecanismos Tipo I y II de fotosensibilización por parte de la riboflavina. Adaptado de (24).

Terapia Fototérmica (PTT)

La terapia térmica se basa en la exposición de una determinada parte del cuerpo a temperaturas mayores de la temperatura corporal normal por un período de tiempo definido. Los primeros indicios de estos efectos en la ayuda contra el cáncer, se remontan al siglo XIX, cuando se observó que la administración de una bacteria viva a pacientes con cáncer causaba una regresión parcial del tumor; este efecto era observado solo en pacientes que desarrollaban la infección bacteriana, proceso que llevaba a la aparición de fiebre (29).

El calor es generado externamente utilizando instrumentos que producen campos electromagnéticos (microondas o radioondas) o ultrasonido (30). En particular, cuando el aumento de temperatura se logra mediante radiación electromagnética nos referimos a terapia fototérmica (PTT, del inglés: photothermal therapy).

La eficacia de este tipo de terapia se encuentra dada por dos factores principales: la magnitud del aumento de temperatura y la duración del tratamiento. Dependiendo de la magnitud del incremento de temperatura, los tratamientos térmicos y sus efectos en células tumorales pueden clasificarse de la siguiente manera (ver Figura) (29):

- Tratamientos con daños irreversibles: Son llevados a cabo incrementando la temperatura del tumor por encima de 48°C durante un período de tiempo que excede varios minutos. La muerte celular se produce por necrosis. Los daños no solo ocurren en las células tumorales, sino también en el tejido sano que se encuentra alrededor. Por arriba de los 60°C se produce la instantánea e irreversible desnaturalización de las proteínas.
- Tratamientos de hipertermia: Consiste en mantener la temperatura del tumor entre 41-48°C. Suele usarse en combinación con otros tratamientos, como la quimioterapia o la radioterapia, cuyas eficiencias aumentan luego de un tratamiento hipertérmico. Entre los 41 y 43°C comienza la desnaturalización de las proteínas y se produce una inactivación celular que puede durar varias horas: al reactivarse las células, las mismas logran adquirir cierta resistencia al calor. Tratamientos más severos (43-45°C), producen una inactivación más prolongada y a su vez la aparición de un estrés oxidativo debido al incremento intracelular de las especies reactivas de oxígeno. La hipertermia conocida como supresiva (45-48°C), produce una necrosis rápida de las células cancerosas que resultan resistentes a tratamientos hipertérmicos estándar.
- Tratamientos de diatermia: Consiste en el aumento de la temperatura hasta 41°C. A esta temperatura no se producen grandes modificaciones a nivel celular, pero se logra un incremento del flujo sanguíneo y una mayor difusión a través de las membranas celulares, favoreciendo: i) el ingreso de las drogas antitumorales a tumores que no se encuentran muy vascularizados (beneficioso para la quimioterapia), ii) la oxigenación celular (beneficioso para la radioterapia), y iii) la llegada de células del sistema inmune.

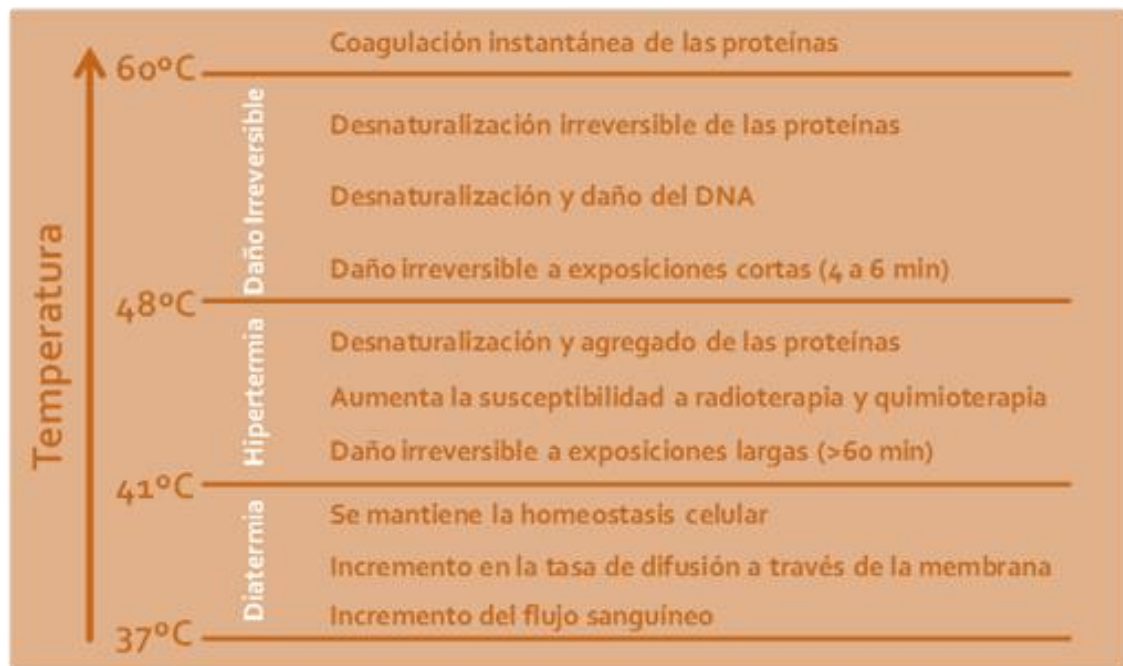


Figura 6: Clasificación de los tratamientos térmicos. Adaptado de (17).

Terapia fototérmica y nanotecnología

Las nanopartículas combinan 4 propiedades muy interesantes que las hacen útiles en este tipo de terapias (29):

- Su tamaño menor a 100 nm les permite una larga circulación en el flujo sanguíneo y una fácil incorporación dentro de las células.
- Pueden dispersarse en líquidos biocompatibles, haciéndolas fácilmente inyectables al organismo.
- Suelen presentar mínimos efectos adversos en ausencia de estímulos externos.
- Producen calor de forma muy eficiente cuando son excitadas externamente.

En los últimos años, se ha prestado gran atención a nanopartículas que puedan generar calor al ser irradiadas con láser cuando se encuentran ya dentro del tumor, ya que de esta manera no se necesitarían grandes energías de irradiación y se minimizaría el daño a los tejidos sanos vecinos. Esto último también puede lograrse utilizando láseres de longitudes de onda que se encuentren dentro de la región en la que los tejidos suelen ser transparentes. A estas regiones se las conocen como ventanas biológicas o ventanas terapéuticas, y van de 700 a 980 nm y de 1000 a 1400 nm (29).

Para que las nanopartículas sean útiles en PTT deben cumplir una serie de requisitos (29):

- Poseer una alta absorción en las longitudes de onda de las ventanas biológicas.
- Tener baja toxicidad.
- Ser fácilmente funcionalizables para facilitar su ingreso en los tumores.
- Ser dispersables en líquidos biocompatibles.

Unas buenas candidatas que cumplen con estas características son las nanopartículas de metales nobles, debido a su efecto fotofísico de LSPR. Cuanto más al infrarrojo cercano (NIR, del inglés: Near Infrared) pueda correrse la banda del LSPR de las nanopartículas, más útiles serán para la terapia fototérmica. Al irradiar estas partículas con luz de longitud de onda que se solape fuertemente con la banda de absorción LSPR de la partícula, se logra un gran aumento de temperatura y una muy útil disipación de calor desde las mismas hacia el entorno (3).

Bibliografía

1. Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL. Principios de bioquímica. Omega; 2006.
2. Lodish H. Biología celular y molecular. Médica Panamericana; 2005.
3. Huang X, El-Sayed MA. Plasmonic photo-thermal therapy (PPTT). Alexandria Journal of Medicine [Internet]. 2011; 47(1):1–9.
4. Bialik S, Zalckvar E, Ber Y, Rubinstein AD, Kimchi A. Systems biology analysis of programmed cell death. Trends in Biochemical Sciences. 2010; 35(10): 556-564.
5. Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). International Journal of Oncology. 2002; 21(1): 165-170
6. Nishida K, Yamaguchi O, Otsu K. Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease. Circulation Research. 2008; 103:343–351.
7. Cohen GM, Sun XM, Fearnhead H, MacFarlane M, Brown DG, Snowden RT, Dinsdale D. Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950). 1994; 153(2): 507-516
8. Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: Death by a thousand cuts Cell. 1995; 82(3):349-352.
9. Liu J jie, Lin M, Yu J ying, Liu B, Bao J ku. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. Cancer Letters. 2011; 300(2):105-114.
10. Huett A, Goel G, Xavier RJ. A systems biology viewpoint on autophagy in health and disease. Current Opinion in Gastroenterology. 2010; 26(4):302-309.
11. He C, Klionsky DJ. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. Annual Review of Genetics. 2009; 43:67-93.
12. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A. Life and death partners: Apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. Cell Death and Differentiation. 2009; 16(7): 966-975.
13. McCall K. Genetic control of necrosis - another type of programmed cell death. Current opinion in cell biology. 2010; 22(6):882-888
14. Wu W, Liu P, Li J. Necroptosis: An emerging form of programmed cell death. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2012; 82(3):249-258.
15. Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ, Thompson CB. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. Genes and Development. 2004; 18(11):1272-1282.

16. Daniell MD, Hill JS. a History of Photodynamic Therapy. Australian and New Zealand Journal of Surgery. 1991; 61(5):340–348.
17. Juarranz Á, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. Clinical and Translational Oncology. 2008; 10(3):148–154.
18. Henderson BW, Dougherty TJ. How Does Photodynamic Therapy Work? Photochemistry and Photobiology. 1992; 55(1):145–157.
19. Lucky SS, Soo KC, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. Chemical Reviews. 2015; 115(4):1990–2042.
20. Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. Advanced Drug Delivery Reviews. Elsevier B.V. 2008; 60(15):1627–1637.
21. Zhang Y, Aslan K, Malyn SN, Geddes CD. Metal-enhanced phosphorescence (MEP). Chemical Physics Letters. 2006; 427(4–6):432–437.
22. Zhang Y, Aslan K, Previte MJR, Malyn SN, Geddes CD. Metal-enhanced phosphorescence: Interpretation in terms of triplet-coupled radiating plasmons. Journal of Physical Chemistry B. 2006; 110(49):25108–25114.
23. Powers HJ. Riboflavin (vitamin B-2) and health. American Journal of Clinical Nutrition. 2003; 77(6):1352–1360.
24. Cardoso DR, Libardi SH, Skibsted LH. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. Food & Function. 2012; 3(5):487.
25. Silva E, Edwards AM. Flavins Photochemistry and Photobiology. Access. 2006. 2-3.
26. Krishna CM, Uppuluri S, Riesz P, JR JSZ, Balasubramanian D. A study of the photodynamic efficiencies of some eye lens constituents. Photochemistry and Photobiology. 1991; 54(1):51–58.
27. Li H, Melø TB, Razi Naqvi K. Triplets, radical cations and neutral semiquinone radicals of lumiflavin and riboflavin: An overhaul of previous pump-probe data and new multichannel absolute absorption spectra. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. Elsevier B.V.; 2012; 106(1):34–39.
28. Baier J, Maisch T, Maier M, Engel E, Landthaler M, Bäuml W. Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers. Biophysical journal. 2006; 91(4):1452–1459.
29. Jaque D, Martínez Maestro L, del Rosal B, Haro-Gonzalez P, Benayas a, Plaza JL, Rodriguez ME, Garcia Solé J. Nanoparticles for photothermal therapies. Nanoscale. 2014; 6(16):9494–9530.
30. Abadeer NS, Murphy CJ. Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles. Journal of Physical Chemistry C. 2016; 120(9):4691–4716.



Objetivos

“La educación es el arma más poderosa que puedes usar para cambiar el mundo”

Nelson Mandela

Objetivo General

El presente trabajo de tesis tiene como objetivo general el empleo de nanomateriales de metales nobles (plata y oro) en dos tipos de terapias alternativas para el tratamiento del cáncer: la terapia fotodinámica (PDT) y la terapia fototérmica (PTT).

Objetivos Específicos

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata y oro estabilizadas con pectina (PecAgNP y PecAuNP).
- Examinar el efecto de la presencia de dispersiones de PecAgNP y PecAuNP sobre la fotofísica del fotosensibilizador riboflavina (Rf) para su uso en PDT.
- Examinar el efecto de dispersiones de PecAgNP y PecAuNP sobre los rendimientos cuánticos de generación de ROS por parte de la Rf.
- Investigar la viabilidad y morfología de células HeLa incubadas con PecAgNP y PecAuNP, Rf y mezclas de Rf y los nanomateriales, en oscuridad y con irradiación de longitud de onda adecuada.
- Sintetizar y caracterizar nanoplatos de plata con estabilizantes biocompatibles.
- Investigar la capacidad de liberación de calor fotoinducida por parte de nanoplatos de plata para su uso como elementos alternativos en PTT.
- Explorar la generación de $O_2(^1\Delta_g)$ por irradiación de dispersiones de nanoplatos de plata.
- Explorar la viabilidad, la morfología y los cambios metabólicos de células incubadas con los nanoplatos e irradiadas con luz de longitud de onda adecuada con el objetivo de evaluar su posible aplicación en PTT.
- Examinar el uso de la Rodamina B (RhB) como sensor térmico intracelular mediante microscopías de fluorescencia.



Materiales y Métodos

“Yo vine a este mundo para ser libre y no esclava. Vine para vivir, no para figurar como una mera existencia. Vivo para ser persona y no objeto. Con mis pies aparto toda etiqueta con la cual se pretende controlarme. Me tomo la atribución de cuestionar las verdades asumidas y de hacer profano lo que por siglos se ha tenido por sagrado.”

Nastreen Amina

En este capítulo presentaremos brevemente los materiales empleados y las diferentes técnicas experimentales que se han utilizado en este trabajo.

Materiales

Reactivo	Marca
Acetato de Sodio (NaCH_3COO)	J.T.Baker
Azida de Sodio (NaN_3)	Sigma Aldrich
Ácido Sulfúrico (H_2SO_4)	Cicarelli
Alcohol Furfúrico ($\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_2$)	Sigma Aldrich
Anexina V	BD Pharmingen
Anexina V conjugada con Isotiocianato de fluoresceína	Sigma Aldrich
Borohidruro de Sodio (NaBH_4)	Sigma Aldrich
Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)	Sigma Aldrich
Citrato de Sodio	J.T.Baker
Cloruro Férrico Hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	J.T.Baker
Hidróxido de Sodio (NaOH)	J.T.Baker
Ioduro de Propidio	BD Pharmingen
MEM	GIBCO
Mito Tracker	Thermofisher
Nitrato De Plata (AgNO_3)	Biopack
o-Fenantrolina	Anedra
OPTIMEM	GIBCO
Oxalato de Potasio monohidratado ($\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Anedra
Pectina	Sigma Aldrich
Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)	Anedra
Polietilenglicol (PEG)	Sigma Aldrich
Polivinilpirrolidona (PVP)	Sigma Aldrich
Riboflavina (Rf)	Sigma Aldrich
Rodamina B (RhB)	Sigma Aldrich
Rojo Neutro	Sigma Aldrich
Suero Fetal Bovino (FBS)	Internegocios S.A.
Sulfato de Cobre (CuSO_4)	Sigma Aldrich
Sulfato de Hierro (II) heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Sigma Aldrich
Tetracloroaurato de hidrógeno ($\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Sigma Aldrich

Todos los experimentos fueron realizados con agua ultra pura.

El material de vidrio empleado para síntesis de nanopartículas o los diversos experimentos se limpió de forma cuidadosa para evitar contaminaciones por su uso anterior, con las siguientes soluciones:

- Mezcla sulfocrómica: Es una mezcla con alto poder oxidante que se empleó para remover contaminantes orgánicos de todo el material de vidrio y cuarzo previo a su uso. Se preparó disolviendo 5 g de $K_2Cr_2O_7$ en 100 mL de ácido sulfúrico concentrado y se utilizó hasta que su coloración se tornó verdosa.
- Solución “piraña”: Es una solución fuertemente oxidante, compuesta por H_2SO_4 concentrado y H_2O_2 100 vol en una relación volumétrica de $H_2SO_4:H_2O_2$ de 3:1. Se prepara agregando lentamente el ácido sobre el peróxido en baño de hielo. Esta solución ataca violentamente los materiales orgánicos, por lo que se debe manipular con extrema precaución.
- Agua regia: El material que ha estado en contacto con metales o sustancias orgánicas fue lavado con agua regia, que consiste en una mezcla de HCl y HNO_3 concentrados en una relación volumétrica de $HCl:HNO_3$ 3:1. Esta solución disuelve los metales que se encuentren adheridos al material y ataca la materia orgánica.

Métodos

Espectroscopía UV-Visible

Las medidas de los espectros UV-Visible de las distintas muestras se efectuaron con un espectrofotómetro T90UV PG INSTRUMENTS LIMITED doble haz con ancho de banda de 1 nm. El equipo cuenta con una lámpara tungsteno-halógeno para la parte visible del espectro y una de deuterio para el rango ultravioleta. Contiene además un accesorio de esfera integradora para la medida de reflectancia difusa. Para las determinaciones se usaron celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. En las determinaciones en las que se usó la esfera integradora, las celdas utilizadas fueron de 0,1 cm.

Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

Esta técnica se utilizó para la caracterización de forma y tamaño de las distintas nanopartículas empleadas en esta tesis. Las imágenes obtenidas por TEM fueron realizadas usando diversos equipos:

- Las imágenes de las nanopartículas de plata cubiertas con pectina fueron tomadas con un equipo Phillips CM200-UT (LaB6) operado a 200 kV.
- Las micrografías de las nanopartículas de oro cubiertas por pectina fueron tomadas con un equipo JEOL JEM 1010 operado a 120 kV.
- Las imágenes de los nanoplatos de plata fueron tomadas con un equipo FEI Tecnai F20 G2 (FEG) operado a 200 kV.

En todos los casos, las muestras fueron preparadas colocando una gota de las suspensiones de las distintas nanopartículas en las grillas. Las grillas fueron colocadas en papel de filtro y secadas bajo corriente de argón, nitrógeno o aire. El análisis estadístico de las imágenes obtenidas se realizó empleando el software Image J.

Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Para poder caracterizar los grupos funcionales presentes en las nanopartículas, las medidas de microscopía FTIR fueron llevadas a cabo con un Espectrómetro Thermo Scientific Nicolet 380, con un accesorio ATR (del inglés: Attenuated Total Reflection) Pike Miracle. Los espectros se obtuvieron a partir de muestras sólidas, se midieron en un rango entre 550 y 4000 cm^{-1} con una resolución de 1 cm^{-1} .

Medidas de Potencial Z

Las medidas de potencial Z fueron realizadas para evaluar la magnitud de las atracciones/repulsiones de cargas entre partículas, lo que nos permitió saber cómo estaban afectadas la superficie y la estabilidad de las mismas.

Las medidas se realizaron con un instrumento ζ -Sizer en forma automatizada a 25°C, con 3 medidas consecutivas a distintos valores de pH.

Espectroscopías de Emisión

- Medidas de Fluorescencia en Estado Estacionario: Para obtener los distintos espectros de fluorescencia se utilizó un espectrofluorómetro HORIBA JOBIN-YVON Spex Fluorolog FL3-11 con ancho de rendija de entrada y de salida de 1 nm. El paso de longitud de onda de barrido fue de 1 nm y el tiempo de integración en cada paso de 0,3 segundos. El equipo consta de una lámpara de Xenón de 450 W. Posee 2 tipos de monocromadores, uno optimizado para longitudes de onda cercanas a 330 nm y otro a 550 nm. La emisión es recogida en un arreglo a 90° del haz de excitación y pasa a un detector R928P con tubo fotomultiplicador. Las medidas fueron llevadas a cabo con soluciones saturadas en aire a temperatura ambiente y las muestras utilizadas fueron diluidas de modo de evitar la saturación de medición del detector.
- Medidas de Fluorescencia resueltas en el tiempo: Para realizar las medidas de tiempo de vida de fluorescencia, se utilizó el mismo equipo descrito anteriormente (HORIBA JOBIN-YVON Spex Fluorolog FL3-11) con la técnica de TCSPC (del inglés: Time Correlated Single Photon Counting). La fuente de excitación utilizada fue un LED de 388 nm. Las muestras utilizadas fueron diluidas de modo de evitar la saturación de emisión del detector.

Espectroscopía de absorción UV-visible de transientes resuelta en el tiempo

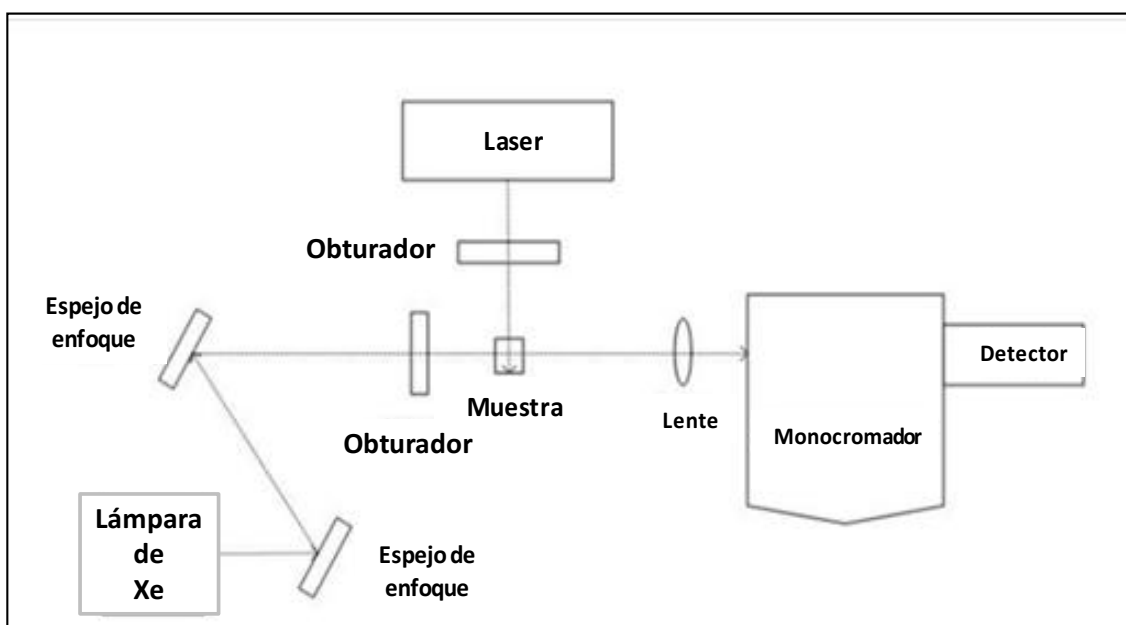
La espectroscopía de transientes resuelta en el tiempo (TAS, del inglés Transient Absorption Spectroscopy) es una extensión de la espectroscopía de absorción estacionaria. En esta, la absorbancia de una muestra, para una longitud de onda particular o para un rango de longitudes de onda, se mide en función del tiempo después de la excitación por un pulso de radiación electromagnética. Dentro de las técnicas TAS, diferenciamos dos casos particulares que fueron utilizados en el presente trabajo:

- Láser Flash Fotólisis: En los experimentos de Láser Flash Fotólisis (LFP, del inglés Láser Flash Photolysis), la ventana temporal de estudio va de los cientos de ns a los ms.

La luz de excitación utilizada fue un láser Nd:YAG Surelite II Continuum. El haz de luz de la lámpara de análisis (de Arco de Xenón de 150W) pasa primero a través de la celda que contiene la muestra (de cuarzo con 1 cm de camino óptico), luego por un monocromador y finalmente es colectado por un fotomultiplicador. Un osciloscopio (detector, Agilent Infiniium 500 MHz) es utilizado luego para tomar las señales de decaimiento, las cuales son obtenidas a partir de un mínimo promedio de 64 pulsos.

Se utilizaron dos equipos diferentes, ambos modelo LP980 de Edinburgh Instruments, disponibles en el INIFTA y en la Universidad Nacional de Río IV.

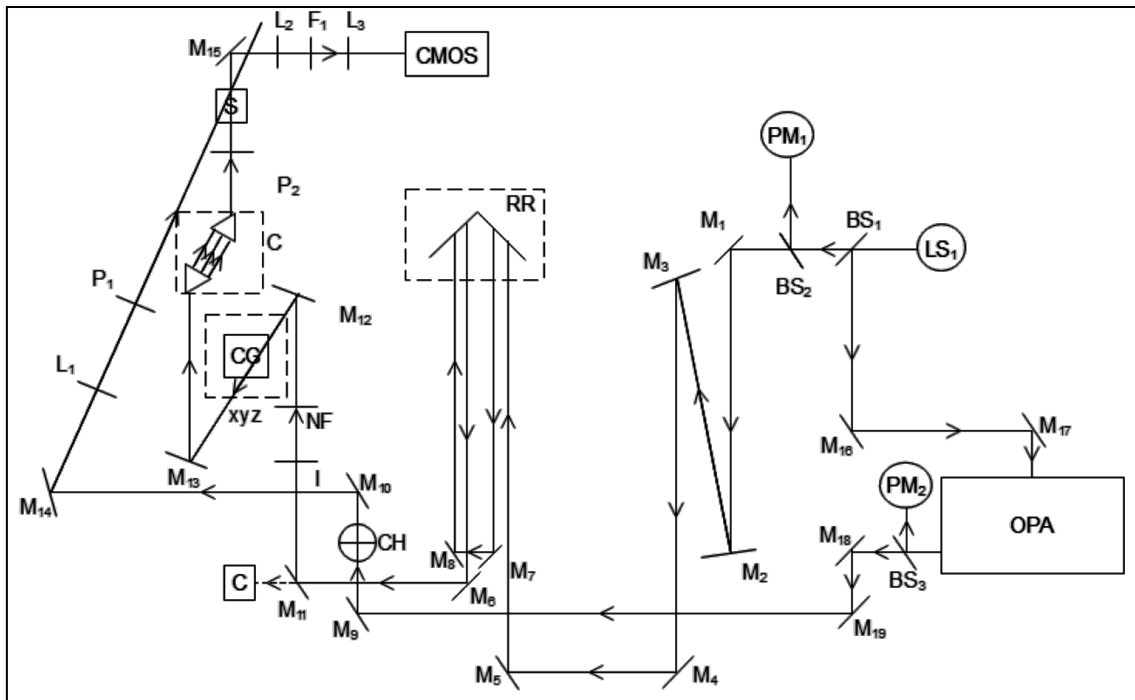
A continuación, se presenta un esquema simplificado de ambos equipos.



Se hicieron además medidas de LFP con excitación a 400 nm. El equipamiento en este caso es similar al descrito anteriormente y se encuentra detallado en el trabajo de Llansola Portoles et.al (1).

- Experimentos de Pump-Probe: En un experimento típico, tanto la luz de excitación, que suele llamarse pulso de bombeo o pump, como el pulso de análisis, llamado pulso de sondeo o probe, son generados por láseres pulsados. Son experimentos de fs-TAS, esto es, absorción de transientes resuelta en los femtosegundos, con una ventana de detección desde los fs a pocos ns.

El arreglo experimental del equipo utilizado se muestra en la siguiente figura adaptada del trabajo de tesis doctoral de Juan José Romero, en la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, año 2017:



La nomenclatura usa LS_i para las fuentes láser, M_i para espejos, BS_i para divisores de haz, PM_i para los medidores de energía de pulso, OPA para el amplificador óptico paramétrico, NF para los filtros neutros, F para los filtros de corte, L para los lentes, P para los polarizadores, RR para el conjunto de espejos que constituyen el retroreflector de la línea de retardo, CH para el selector de pulsos o chopper, C para la cámara de alineación, I para los iris, S para la muestra, CG para el medio activo de generación del supercontinuo de análisis y CMOS para el sistema de detección basado en junturas de óxidos metálicos y semiconductores. Básicamente, el sistema láser (LS_1) consiste en un láser mode locked pulsado (<50 fs) de Ti: Sapphire sintonizable entre 740 y 800 nm Tsunami (Spectra Physics), bombeado por un láser Millenia CW de 532 nm (Spectra Physics). Los pulsos del Tsunami, que se utilizan como pulsos semilla, van a un amplificador regenerativo spitfire (Spectra Physics), que es bombeado por un láser Nd:YLF evolution (Coherent). El sistema completo opera a 1 kHz y el ancho del pulso a mitad de altura en la salida es de aproximadamente 130 fs.

El haz de salida del amplificador spitfire es dividido en 2, una parte del haz se dirige a un amplificador óptico paramétrico (OPA 800C, spectra Physics) en el cual, por procesos de óptica no lineal, se obtienen los pulsos de bombeo (pump), los cuales son monitoreados con un medidor de energía. Estos pulsos son seleccionados usando un chopper, y luego dirigidos a la muestra usando espejos y lentes y controlando su polarización usando P_1 . La parte restante de la salida del spitfire va a un medidor de energía de pulsos para verificar la constancia de la calidad del haz de salida y al sistema óptico de retardo (compuesto por RR y los espejos M_7 y M_8). Luego pasa por una ventana de un material activo (ventana de zirconia) para generar el pulso de luz blanca (probe) que es controlada a

usando filtros neutros, iris y un compensador C formado por un arreglo de prismas, y finalmente incide en la muestra. Una vez atravesada la misma, la luz de análisis se dirige a través de filtros y lentes a una fibra óptica que conecta con el detector CMOS que se registra usando un boxcar. La resolución del equipo en su conjunto es de ~ 150 fs. La potencia del haz de excitación en las distintas longitudes de onda empleadas medidas frente a la muestra se mantuvo cercana a $200 \mu\text{W}$ (2–4).

Como los espectros obtenidos en estas escalas de tiempo cortas muestran la contribución de varias especies, los análisis de estos resultados se realizaron de forma global. Se presentan espectros diferencia asociados a la evolución (EADS, del inglés: Evolution-Associated Difference Spectra) y espectros diferencia asociados al decaimiento (DADS, del inglés: Decay-Associated Difference Spectra). El programa utilizado para el análisis calcula ambos tipos de espectros, y las constantes de tiempo obtenidas del análisis aplican a ambos tipos (5). Los errores asociados a los tiempos de vida obtenidos son $\leq 5\%$.

Estas medidas fueron realizadas en Arizona State University, en el laboratorio de los Profesores Ana Moore, Thomas Moore y Devens Gust.

Detección de especies reactivas de oxígeno

- Detección por fosforescencia oxígeno singlete: La generación de oxígeno singlete por parte de la Rf en ausencia y presencia de las distintas nanopartículas, fue determinada mediante la detección de su fosforescencia a 1275 nm por la relajación radiativa desde el estado singlete de menor energía al estado triplete basal del oxígeno molecular.

Para ello se utilizaron suspensiones de la Rf y las nanopartículas en agua deuterada (D_2O), las cuales fueron excitadas con el armónico de 355 nm de un láser Nd:YAG Surelite II Continuum. La radiación emitida se detectó en ángulo recto usando un amplificador Judson J 116/8sp y un detector de germanio (5 mm de diámetro). Los decaimientos de la fosforescencia se promediaron y almacenaron en un osciloscopio Agilent Infiniium 500 MHz.

Las medidas fueron realizadas en D_2O debido a que el tiempo de vida de oxígeno singlete en agua pesada es mayor que en H_2O , lo que hace que la medida de fosforescencia pueda realizarse con un detector de tiempo de respuesta mayor (6).

También se realizaron medidas de fosforescencia de oxígeno singlete en la Universidad de Aarhus, Dinamarca, utilizando como fuente excitación un láser de femtosegundo.

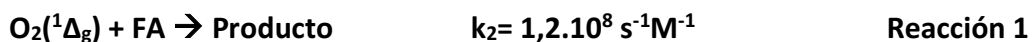
En estos ensayos los pulsos de femtosegundo se generaron en un oscilador Ti: Sapphire bombeado cw-modo-cerrado (Tsunami 3941 bombeado por un láser

Millenia V Nd: YVO₄). El oscilador Ti: Sapphire funciona a 80 MHz y proporciona pulsos de femtosegundos sintonizables (~ 100 femtosegundos de ancho completo en la mitad del máximo, FWHM) en el rango de ~ 730 - 900 nm. La energía del pulso se amplifica en aproximadamente un factor de 105 en un amplificador regenerativo bombeado a 1 kHz (Spitfire bombeado por un láser Evolution de Nd: YLF). El Spitfire opera con una frecuencia de repetición variable, $f = 1000/n$ Hz ($n = 1, 2, 3 \dots$), esto permite obtener pulsos sintonizables de ~ 760 - 850 nm (~ 100 a 150 femtosegundos con un ancho de banda espectral de ~ 10 - 15 nm FWHM) (7,8). Cabe señalar que la frecuencia de repetición 1 kHz del sistema de láser de femtosegundo amplificada es ideal para experimentos resueltos en el tiempo de fosforescencia de oxígeno singlete, ya que su tiempo de vida en este solvente es de unos pocos μ s (6). La salida del Spitfire puede ser dirigida a un amplificador paramétrico óptico (OPA-800CF). Cuando se bombea el OPA, éste puede suministrar pulsos de femtosegundos sintonizables en el rango de 300 a 3.000 nm, lo que mejora significativamente el rango espectral disponible para los experimentos. La longitud de onda elegida para irradiar la muestra en estos experimentos fue de 400 nm.

La intensidad de fosforescencia de oxígeno singlete obtenida se midió colocando un filtro de interferencia de 1275 nm delante de un fotomultiplicador enfriado (PMT, modelo Hamamatsu R5509-42) que se usó en un modo de recuento de fotones. El PMT se enfrió a -80 °C mediante un flujo de nitrógeno gaseoso.

- Medidas de consumo de oxígeno mediante el uso de electrodo sensible a oxígeno molecular: La presencia de oxígeno singlete se detectó también de forma indirecta mediante el monitoreo de consumo de oxígeno molecular en función del tiempo de irradiación. El montaje experimental consta de una lámpara Rayonet de longitud de onda de (350 ± 20) nm como fuente de irradiación en un reactor cerrado donde se coloca la muestra con o sin alcohol furfurílico (FA, un compuesto capaz de reaccionar con el oxígeno singlete en suspensiones saturadas en aire (9)) y un electrodo sensible de oxígeno molecular (Orion 97-0899).

Si se logra ver consumo del oxígeno molecular sería porque el FA reacciona con el oxígeno singlete formado mediante la reacción 1 (10):



- Medidas de cuantificación de agua oxigenada (H₂O₂): Las medidas para cuantificar la cantidad de H₂O₂ producida por cada muestra se llevaron a cabo mediante un método colorimétrico enzimático, el cual se basa en la reacción 2 (11):

Donde: 4-AF es la 4-aminofenazona y POD es la enzima peroxidasa. La fuente de excitación fue el tercer armónico (355 nm) de un láser Nd:YAG Surelite II. Luego de ser irradiada, 1 mL de la muestra fue incubado con 1 mL del reactivo durante 5 minutos a 37°C. La absorción a 505 nm fue medida en el espectrofotómetro descrito anteriormente.

Las absorbancias obtenidas fueron comparadas con las halladas a partir de una curva de calibración realizada con concentraciones conocidas, de modo de poder calcular la cantidad de H₂O₂ generada.

El kit enzimático utilizado fue el Colestat enzimático AA líquida, de la marca Wiener lab.

Cultivo Celular

Células de carcinoma humano (HeLa) fueron crecidas en medio Eagle modificado (MEM, del inglés: Modified Eagle's Medium), con 10% de suero fetal bovino (FBS, del inglés: Fetal Bovine Serum) y 100 µg/mL de penicilina. El cultivo de las células fue llevado a cabo en una incubadora con 5% CO₂ y 95% de aire a 37°C. Se sembraron 1,5x10⁴ células en placas de 96-wells y se dejaron crecer por 24 h hasta confluencia.

Citotoxicidad celular

Luego del crecimiento de las células en placas multi-well por 24 h, el medio fue removido y las células fueron incubadas por 24 h con diferentes concentraciones de soluciones/suspensiones de riboflavina o nanopartículas en MEM, en presencia de luz u oscuridad, de acuerdo con lo que se deseaba probar. Todos los experimentos fueron comparados con respecto a un control de células sin tratamiento. Los ensayos de citotoxicidad utilizados para explorar la viabilidad celular luego de los distintos tratamientos fueron los siguientes:

- Ensayo de reducción de MTT: En este ensayo, la viabilidad celular se determina por la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que ocurre en las mitocondrias de las células vivas (12). El MTT (bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico), es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a formazan, un compuesto insoluble. Este producto de reacción queda retenido en las células, por lo que debe ser liberado por solubilización de las mismas. Se cuantifica así el MTT que fue reducido a formazan, por un cambio de color de amarillo a azul por medida de absorbancia a 550 nm (13).

- Ensayo de captación de Rojo Neutro: El rojo neutro es un colorante captado por los lisosomas y endosomas de las células viables. A medida que las mismas pierden viabilidad, el colorante es liberado al medio de cultivo, ya que solo las células viables son capaces de retener el colorante en su interior. Por lo tanto el ensayo consiste en medir la absorbancia a 540 nm, viendo de esta manera qué cantidad de colorante fue captado por las células (14,15).

Microscopía confocal de disco giratorio (Spinning Disk)

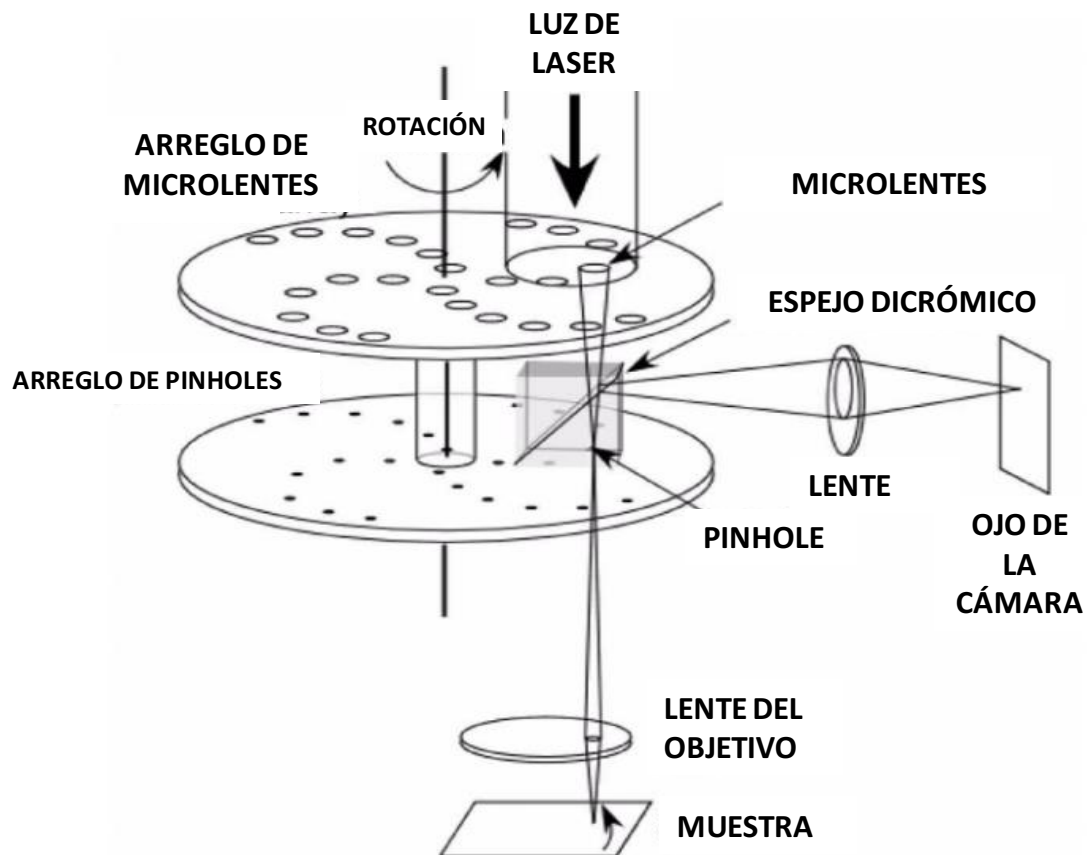
La microscopía confocal es una técnica de microscopía óptica, que logra aumentar la resolución y el contraste de una micrografía mediante el uso de una técnica especial que bloquea la luz desenfocada (16).

La microscopía confocal utiliza como fuente de iluminación distintos tipos de láseres controlados por un sistema acústico-óptico de filtrado capaz de concentrar la máxima intensidad de la luz en el plano de foco a longitudes de onda determinadas. Durante la adquisición de la imagen, el láser barre la muestra a gran velocidad (scanning) y la fluorescencia emitida en cada punto es recogida por un fotomultiplicador (PMT) tras atravesar un pequeño orificio (pinhole), que bloquea el paso de toda señal fuera de foco (17).

La microscopía confocal de disco giratorio se basa en la tecnología de doble disco giratorio de Nipkow, que permite escanear rápidamente el campo sin dañar las células, disminuyendo el fotoblanqueo nocivo y la fototoxicidad (18).

En un microscopio confocal de escaneo láser, el láser explora la muestra con un único agujero para construir la imagen. El microscopio confocal de disco giratorio en cambio usa, como su nombre lo indica, un disco giratorio con miles de orificios dispuestos en forma de espiral. Un segundo disco con un patrón correspondiente de microlentes, guía la luz del láser de irradiación en los distintos “pinholes” del primer disco, lo que aumenta la eficacia de la iluminación. A medida que la luz se proyecta en el disco, los agujeros trazan arcos concéntricos de luz de excitación a través de la muestra. Cuando la luz fluorescente o reflejada vuelve a través del disco, solo la luz del plano de enfoque es capaz de pasar por los orificios. La luz de arriba o debajo del plano focal del objetivo llega al disco en ángulos no rectos. Solo la luz que llega a los poros en ángulos rectos puede penetrar y llegar al detector (18,19).

De esta manera, el microscopio confocal de disco giratorio recolecta múltiples puntos simultáneamente en lugar de escanear un punto por vez, haciendo que la técnica sea más rápida e irradie la muestra con una menor dosis de luz láser. Una cámara CCD posibilita altas velocidades de barrido (18,19). A continuación se muestra un esquema simplificado del microscopio (20):



En el presente trabajo se utilizó un microscopio confocal de disco giratorio marca Nikon Eclips Ti, combinado con una unidad de escaneo confocal (CSU-W1, Yokogawa) y cinco láseres con longitud de onda de excitación de 405 nm, 445 nm, 488 nm, 561 nm y 640 nm. Las imágenes se adquirieron con un objetivo de inmersión en aceite 100x / 1.49 a 512x512 píxeles. El software Andor IQ2 se usó para la adquisición de todas las medidas. En todos los ensayos, el tiempo de exposición se estableció en 200 ms. La potencia del láser y el número de planos focales (cuadros z) se configuraron individualmente para cada registro. Las células se montaron dentro de un sistema de incubación Okolab, con un control preciso de la temperatura (37 ° C), la humedad (85%) y la concentración de CO₂ (5%). Las medidas se realizaron en el grupo del Dr. Thomas Gensch, del Instituto de Sistemas Complejos (ICS-4 (Cellular Biophysics)), Forschungszentrum Jülich, Jülich, Alemania.

Medidas de Microscopía de tiempos de vida de imagen de fluorescencia (FLIM)

El tiempo de vida de fluorescencia de un fluoróforo (τ) es una propiedad física característica y distintiva de cada fluoróforo. FLIM, es una técnica de microscopía que

permite obtener imágenes correlacionadas con los tiempo de vida de los fluoróforos presentes en una muestra (21).

El interés fundamental de esta técnica radica en que el valor de τ no depende de la concentración de fluoróforo ni de la intensidad de iluminación, sino de su entorno, permitiendo así analizar cambios producidos en el entorno celular que pueden ser de pH, polaridad, índice de refracción del medio, temperatura, entre otros (22).

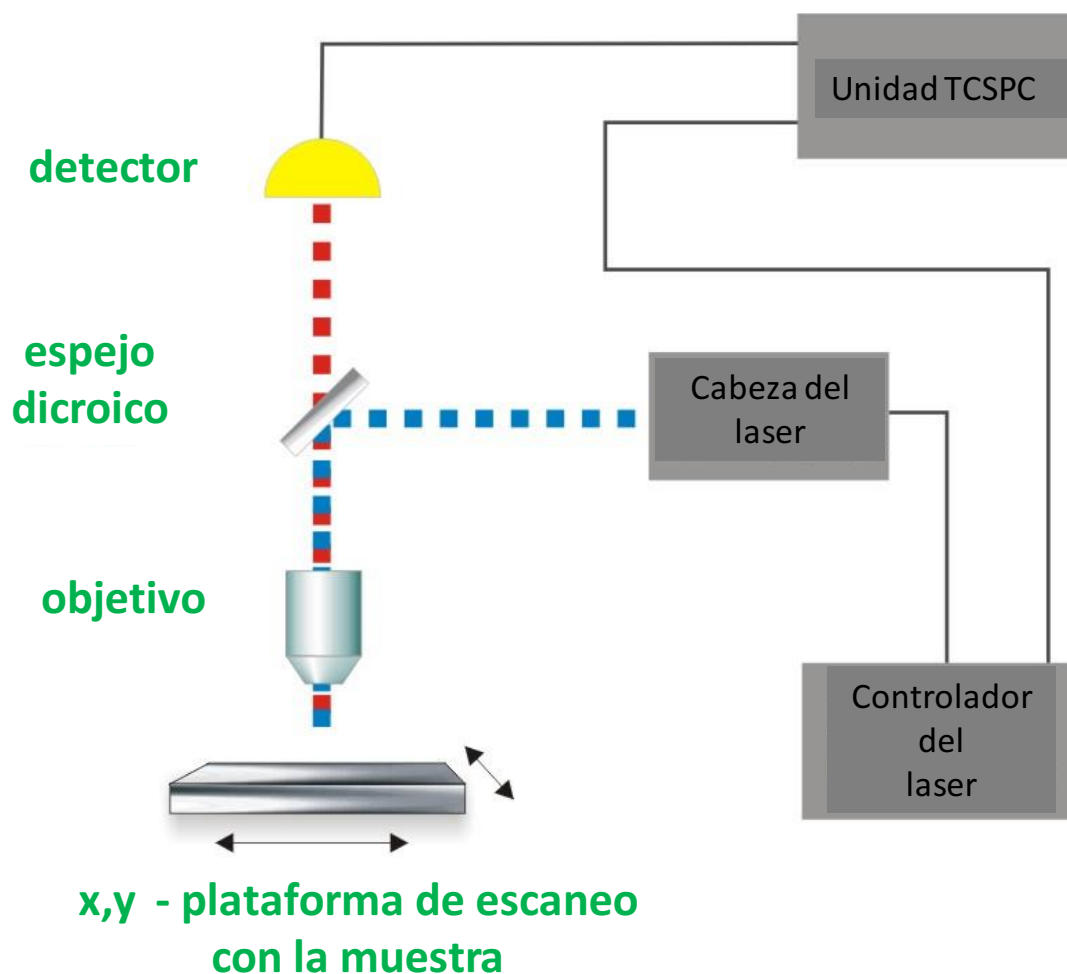
El microscopio que utilizamos en este trabajo determina los tiempos de vida de fluorescencia mediante la técnica de recuento de fotones individuales correlacionados con el tiempo. En el recuento de fotones individuales correlacionados en el tiempo, TCSPC, se mide el tiempo entre la excitación de la muestra por un láser pulsado y la llegada del fotón emitido al detector. Este modo requiere un "inicio" definido, provisto por la electrónica que dirige el pulso láser o un fotodiodo, y una señal definida de "detención", registrada por detectores sensibles a un solo fotón (23). La medición de este retraso de tiempo se repite muchas veces para tener en cuenta la naturaleza estadística de la emisión de fluoróforos. Los tiempos de retardo se ordenan en un histograma que grafica la ocurrencia de emisión a lo largo del tiempo después del pulso de excitación.

Para adquirir una imagen de tiempos de vida de fluorescencia, los fotones se atribuyen a los diferentes píxeles. Las señales del escáner del microscopio confocal se graban adicionalmente para ordenar el flujo de tiempo de los fotones en los diferentes píxeles.

Los componentes esenciales de un microscopio FLIM que funciona en modo TCSPC son:

- Fuente de láser pulsado (diodo láser o excitación de fotones múltiples).
- Detector sensible a un solo fotón.
- Espejo dicróico (para separar la señal de fluorescencia de la luz de excitación).
- Objetivo (para enfocar la luz de excitación en la muestra y recoger la señal de fluorescencia).
- Unidad TCSPC para medir el tiempo entre la excitación y la emisión de fluorescencia.

A continuación, se presenta un esquema simplificado del microscopio con los componentes anteriormente mencionados:



Se utilizó un microscopio Fluotime100 (Picoquant, Berlín, Alemania) basado en una unidad picoHarp300 con un láser de diodo pulsado (Láser Picoquant LDHC440; emisión: 440 nm; ancho de pulso: 50 ps; frecuencia de repetición utilizada: 20 MHz) como fuente de excitación. La luz de excitación tenía polarización vertical, y la detección se realizó con un polarizador de emisión orientado a $54,7^\circ$ desde la vertical. El conteo de fotones individuales correlacionado por tiempo se usó para medir curvas de decaimiento de fluorescencia en función del tiempo (t), lo que permite la determinación de componentes de emisión de fluorescencia con tiempos de vida de fluorescencia superiores a 100 ps. Las curvas de decaimiento se analizaron mediante reconversión iterativa de la función de respuesta del instrumento, $IRF(t)$, con una función de modelo exponencial, $M(t)$, usando el software FluoFit (versión 4.5.3.0; Picoquant). Estas medidas se realizaron en el grupo del Dr. Thomas Gensch, del Instituto de Sistemas Complejos (ICS-4 (Cellular Biophysics)), Forschungszentrum Jülich, Jülich, Alemania.

Microscopía FTIR con radiación sincrotrón

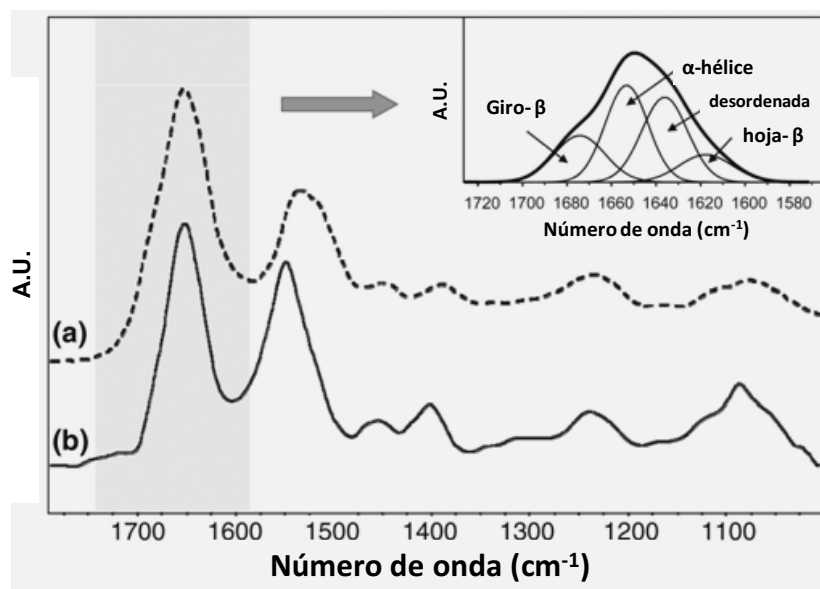
Las medidas de microespectroscopía infrarroja por transformada de Fourier basada en radiación sincrotrón (SR-FTIR) fueron realizadas en la línea SMIS del sincrotrón SOLEIL, Saint-Aubin, Francia.

Esta técnica de espectroscopía vibratoria se usa como una herramienta de diagnóstico útil para probar cambios moleculares dentro de las células o tejidos sometidos a diferentes tratamientos. La técnica permite la determinación de cambios estructurales de las biomoléculas más importantes: proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (24). Se explican los detalles para cada biomolécula:

- **Proteínas:** El espectro FTIR de una proteína tiene dos características principales, la banda perteneciente a la Amida I ($1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) y la banda perteneciente a la Amida II ($1500\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$). Estas bandas surgen principalmente del estiramiento vibracional de los enlaces C=O y C-N pertenecientes a la cadena principal del péptido. La espectroscopía FTIR ha demostrado ser particularmente sensible a la estructura secundaria de las proteínas, basada en la frecuencia vibratoria de la banda de la Amida I, la cual se ve afectada por diferentes entornos de los enlaces puente de hidrógeno pertenecientes a las estructuras secundarias de α -hélice, hoja- β y otras estructuras desordenadas. Para la mayoría de las proteínas, existe una mezcla de estas estructuras secundarias, y en este caso, la banda de la Amida I representa una combinación de estos componentes. Por lo tanto, esta puede analizarse para predecir la estructura secundaria de una proteína, y por lo tanto los cambios que esta puede sufrir (25–27).
- **Ácidos Nucleicos:** Los espectros obtenidos para los ácidos nucleicos, tienen contribuciones de las vibraciones de estiramiento C=O de las bases purinas (1717 cm^{-1}) y pirimidinas (1666 cm^{-1}). Además, la región entre 1000 y 1500 cm^{-1} contiene contribuciones de las vibraciones antisimétricas (1224 cm^{-1}) y simétricas (1087 cm^{-1}) del grupo PO_2^- (28).
- **Lípidos:** Las bandas características del espectro lipídico se encuentran en la región $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$. Están asignadas a las vibraciones de estiramiento C-H antisimétricas y simétricas de los grupos CH_3 (2956 y 2874 cm^{-1}), y a las vibraciones de estiramiento C-H antisimétricas y simétricas de CH_2 (2922 y 2852 cm^{-1}). Además, una banda fuerte a 1736 cm^{-1} surge de los grupos éster C=O de los lípidos (28).

A continuación, se muestra a modo de ejemplo: (a) un espectro FTIR característico de una célula A431 depositada en portaobjetos de CaF_2 ; (b) Un espectro

FTIR de una célula A431 en solución acuosa. En el inset se muestra la deconvolución de los espectros pertenecientes a la banda de la Amida I de una proteína (figura adaptada de (28)).



Con esta técnica se logra una mayor resolución espacial pudiendo analizar distintos compartimientos celulares con mayor calidad de los espectros, en comparación con la microespectroscopía clásica FTIR. Esto es debido a que la radiación sincrotrón permite el análisis de regiones de menor tamaño (entre 2 y 10 micrones) con una mayor cantidad de fotones detectados que en las fuentes de radiación comunes (29–31).

Se tomaron entre 50 y 100 espectros celulares específicamente en los núcleos de las células en modo de transmisión para ser posteriormente analizados.

- Análisis de componentes principales (32): Los análisis de los espectros y la comparación de los distintos tratamientos, fueron realizados mediante el análisis de componentes principales (PCA). El PCA es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables). Es decir, ante un banco de datos con muchas variables, el objetivo es reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible. Con este análisis se crean nuevas variables (componentes principales) que son combinaciones lineales de las variables observadas.

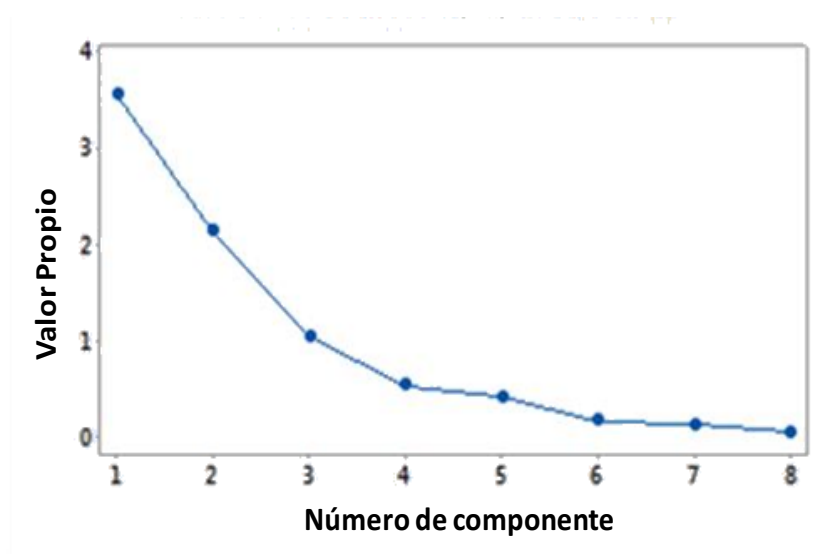
El objetivo del análisis de componentes principales consiste en explicar la máxima cantidad de varianza con el menor número de componentes principales.

Por lo tanto, se realiza una elección de factores de tal forma que el primero recoja la mayor proporción posible de la variabilidad original; el segundo factor debe recoger la máxima variabilidad posible no recogida por el primero,

y así sucesivamente. Del total de factores se eligen aquellos que recojan el porcentaje de variabilidad que se considere suficiente. A éstos se los denominan componentes principales.

Una vez seleccionados los componentes principales, se representan en forma de matriz. Cada elemento de ésta representa los coeficientes factoriales de las variables (valores propios: las correlaciones entre las variables y los componentes principales). La matriz tendrá tantas columnas como componentes principales y tantas filas como variables.

Luego se realizan los gráficos de sedimentación (valores propios vs. número de componentes), los cuales nos sirven para seleccionar el número de componentes que se usarán con base en el tamaño de los valores propios. El patrón ideal es una curva pronunciada, seguida de una inflexión y luego de una línea recta. Los componentes que se deben utilizar son los que se encuentran en la curva pronunciada antes del primer punto que inicia la tendencia de línea. Por ejemplo, según en el siguiente gráfico, 3 componentes principales serían suficientes para explicar el análisis, los componentes principales restantes explican una proporción muy pequeña de la variabilidad (cercana a cero) y probablemente carezcan de importancia.



Una vez determinado el número de componentes principales, el cálculo de las puntuaciones factoriales (puntuaciones que tienen los componentes principales para cada caso) se realiza según la Ecuación 1.

$$X_{if} = a_{i1} \cdot Z_{1j} + \dots + a_{ik} \cdot Z_{kj} = \sum_{s=1}^k a_{is} \cdot Z_{sk} \quad \text{Ecuación 1}$$

Los “a” son los coeficientes y los “Z” son los valores estandarizados que tienen las variables en cada uno de los ensayos “s” de la muestra.

Estas puntuaciones pueden graficarse una en función de otra para obtener un gráfico bidimensional que permite ver la variabilidad de las observaciones y si existe alguna que ofrezca un valor extrañamente alto o bajo en cada eje. Este tipo de análisis puede facilitarse mediante el cálculo de intervalos de confianza bidimensionales.

En nuestro análisis de datos se aplicó el algoritmo de Savitzky-Golay para realizar una corrección de referencia de los datos en bruto (espectros de orden cero) o para evaluar la segunda derivada de los datos (espectros de segundo orden) (33). Antes de ejecutar las rutinas de PCA, los espectros obtenidos por estos últimos procedimientos fueron normalizados a la unidad dentro del rango de número de onda deseado.

Espectroscopía de fotoacústica resuelta en el tiempo

Esta técnica se utilizó para evaluar la fracción de energía absorbida por las nanopartículas que es liberada al medio en forma rápida como calor. La técnica de espectroscopía inducida por láser es una aplicación fotocalorimétrica que utiliza como fundamento que la liberación de energía del estado excitado de una molécula genera una onda acústica como producto de los cambios de presión que se producen en el solvente durante la relajación de los estados excitados.

En las técnicas de fotoacústica, la amplitud de la señal acústica de la muestra contiene información de los cambios de volumen térmico ΔV_{th} y estructural ΔV_{str} producidos luego de la absorción de luz. La contribución del ΔV_{th} está relacionada con la expansión del solvente originada por el calor liberado en los procesos de decaimientos no-radiativos de los estados excitados y solo depende de los parámetros termoelásticos del solvente. Por otro lado, el ΔV_{str} es debido a la contracción o expansión producida por reordenamientos moleculares (solute y solvente) en la reacción fotoquímica (34).

El láser usado como fuente de excitación fue un láser Ti: Sapphire de Spectra Physics, con pulsos de 120 fs de ancho centrado a 800 nm de longitud de onda. La energía de los pulsos utilizada en estos experimentos fue de 600 μJ .

El rayo láser ingresó a través de un orificio de 1 mm de diámetro delante de la cubeta.

El sistema de detección consistía en un transductor piezoeléctrico de cerámica preparado manualmente de 4 mm de espesor x 4 mm de diámetro (PZT). El mismo se encontraba ubicado contra una de las caras laterales de la cubeta, la paralela a la dirección del rayo láser.

Las señales acústicas detectadas se amplificaron y digitalizaron mediante un osciloscopio digital (TDS 3032, Tektronix) y se almacenaron en una PC.

La cubeta se encontraba sobre un soporte de control de temperatura ($\pm 0,1$ ° C).

La referencia calorimétrica fue CuSO_4 . Las absorbancias de la referencia y de las muestras, fueron las mismas con un error máximo del 5%.

Las señales generadas mediante 128 disparos del láser, en iguales condiciones para las muestras y la referencia, se promediaron para obtener una mejor relación señal / ruido.

Actinometría

Con el objeto de determinar la intensidad de radiación que llega a las soluciones utilizadas en los ensayos de fotoirradiación, se llevó a cabo el método de actinometría del oxalato férrico $\text{K}_3\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. El mismo es uno de los actinómetros más prácticos utilizados para evaluar intensidades de radiación comprendidas entre 200 y 500 nm.

El $\text{K}_3\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_4)_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ no existe como producto comercial, por lo que fue preparado en el laboratorio mezclando 15 mL de $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 1,5 M con 5 mL de FeCl_3 1,5 M.

La velocidad de fotones incidente (P_0) definida como el número total de fotones que ingresa a la solución por unidad de tiempo y unidad de volumen puede calcularse para una lámpara policromática por medio de la Ecuación 2:

$$P_0 = \frac{\left(\frac{d[\text{Fe}^{+2}]}{dt} \right)}{\sum_i p_i (1 - 10^{-A_i}) \Phi_{\text{Ac}, i}}$$

Ecuación 2

Donde:

- El subíndice i se refiere a pequeños intervalos finitos de longitud de onda, la suma de todos los intervalos abarca la región de λ entre 200 y 500 nm.
- $d[\text{Fe}^{+2}]/dt$ es la velocidad de formación de Fe^{+2} (calculada a partir de la pendiente de un gráfico $[\text{Fe}^{+2}]$ vs tiempo).
- p_i es la función de probabilidad de la emisión fotónica de la lámpara.
- A_i es la absorbancia media de la solución.
- $\Phi_{\text{Ac}, i}$ es el rendimiento cuántico global del actinómetro usado (en este caso ferrioxalato de potasio) en el intervalo i de longitudes de onda.

Para asegurar la absorción de toda la radiación por parte de la solución actinométrica, se utilizó una solución 0,02 M de ferrioxalato de potasio cuyo pH se ajustó

a un valor de 3,0 con HClO_4 . La absorbancia de esta solución para un camino óptico de 1 cm es mayor que 2 entre 200 y 480 nm. En estas condiciones el término $(1-10^{-Ai})$ dentro de la sumatoria de la ecuación se reduce a 1 en todo el intervalo de longitudes de onda estudiado. El rendimiento cuántico de producción de iones Fe^{+2} ($\Phi_{Ac,\lambda}$) tiene un valor prácticamente constante de 1,24 en el intervalo comprendido entre 200 y 360 nm (12). Este número fue el utilizado en los cálculos debido a que se emplearon lámparas que emiten alrededor de 350 nm.

El método consiste entonces en irradiar una solución acuosa de oxalato férrico a distintos tiempos, con la misma geometría utilizada en los ensayos para los que deseamos obtener la intensidad de radiación, de manera que el Fe^{+3} se reduzca a Fe^{+2} (36). El Fe^{+2} producido se cuantifica por complejación del mismo con o-fenantrolina, dando como resultado una solución de color rojizo por la formación de fenantrolina ferrosa, la cual absorbe a 510 nm ($\epsilon^{510} = 11428 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). El numerador de la Ecuación 2 se obtiene a partir del perfil de concentración de Fe^{+2} y el denominador se calcula conociendo el espectro de emisión de la lámpara.

Equipamiento menor

- Los distintos reactivos fueron pesados en una balanza electrónica marca Denver modelo TP-214 de $\pm 0,1 \text{ mg}$ de precisión.
- Para experimentos que requerían la ultrasonificación de suspensiones/soluciones, se utilizó un equipo marca TESLAB S.R.L. Modelo TB04TA con una potencia de 160 W y una frecuencia de 40 kHz.
- Los cambios de solvente para las medidas de fosforescencia de oxígeno singlete se llevaron a cabo en un evaporador rotatorio Senco, acoplado a una bomba mecánica de vacío. Los gases evacuados fueron atrapados con una trampa de nitrógeno líquido.
- Las medidas de pH se hicieron con un pHmetro modelo Consort C832.

Bibliografía

1. Llansola-Portoles MJ, Bergkamp JJ, Tomlin J, Moore TA, Kodis G, Moore AL, Cosa G, Palacios RE. Photoinduced electron transfer in perylene-TiO₂ nanoassemblies. *Photochemistry and Photobiology*. 2013; 89(6):1375-1382.
2. Megiatto JD, Antoniuk-Pablant A, Sherman BD, Kodis G, Gervaldo M, Moore TA, et al. Mimicking the electron transfer chain in photosystem II with a molecular triad thermodynamically capable of water oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012; 109(39):15578–83.
3. Sullivan I, Brown CL, Llansola-Portoles MJ, Gervaldo M, Kodis G, Moore TA, Gust D, Moore AL, Maggard PA. Photoinjection of High Potential Holes into Cu₅Ta₁₁O₃₀ Nanoparticles by Porphyrin Dyes. *Journal of Physical Chemistry C*. 2015; 119(37):21294–21303.
4. Antoniuk-Pablant A, Kodis G, Moore AL, Moore TA, Gust D. Photoinduced Electron and Energy Transfer in a Molecular Triad Featuring a Fullerene Redox Mediator. *Journal of Physical Chemistry B*. 2016; 120(27):6687–6697.
5. Van Stokkum IHM, Larsen DS, Van Grondelle R. Global and target analysis of time-resolved spectra. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 2004; 1657(2–3):82–104.
6. Ogilby PR. Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chemical Society Reviews*. 2010; 39(8):3181.
7. Arnbjerg J, Johnsen M, Frederiksen PK, Braslavsky SE, Ogilby PR. Two-photon photosensitized production of singlet oxygen: Optical and optoacoustic characterization of absolute two-photon absorption cross sections for standard sensitizers in different solvents. *Journal of Physical Chemistry A*. 2006; 110(23): 7375–7385
8. Skovsen E, Snyder JW, Ogilby PR. Two-photon singlet oxygen microscopy: the challenges of working with single cells. *Photochemistry and photobiology*. 2006; 82(5):1187-1197.
9. Bosio GN, Gara PD, Einschlag FSG, Gonzalez MC, Del Panno MT, Mártire DO. Photodegradation of soil organic matter and its effect on gram-negative bacterial growth. *Photochemistry and Photobiology*. 2008; 84(5).
10. Haag WR, Hoigne J, Gassman E, Braun A. Singlet oxygen in surface waters - Part I: Furfuryl alcohol as a trapping agent. *Chemosphere*. 1984; 13:631-640.
11. Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. *Clin Chem*. 1974; 20(4):470–475.
12. Shayne GC. Alternatives to in vivo studies in toxicology. *General and applied toxicology*. 1999. 178–82.

13. Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer BJ, Boobis A, Carere A, Kevekordes S, Lhuguenot JC, Pieters R, Kleiner J. Methods of in vitro toxicology. Food and Chemical Toxicology. 2002; 40(2–3):193–236.
14. Reinecke SA, Helling B, Reinecke AJ. Lysosomal response of earthworm (*Eisenia fetida*) coelomocytes to the fungicide copper oxychloride and relation to life-cycle parameters. Environmental Toxicology and Chemistry. 2002; 21(5):1026–1031.
15. Girón ME, Aguilar I, Romero L, Sánchez EE, Pérez JC, Rodríguez-Acosta A. A low-cost method to test cytotoxic effects of *Crotalus vegrandis* (Serpentes: Viperidae) venom on kidney cell cultures. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 2005; 47(3):147–152.
16. Pawley JB. Handbook of biological confocal microscopy: Third edition. Handbook of Biological Confocal Microscopy: Third Edition. 2006.
17. Conchello JA, Lichtman JW. Optical sectioning microscopy. Nature Methods. 2005. 920–31.
18. Toomre DK, Langhorst MF, Davidson MW. Introduction to Spinning Disk Microscopy. Zeiss. 2009.
19. Oreopoulos J, Berman R, Browne M. Spinning-disk confocal microscopy. Methods in cell biology. 2014. 153–175.
20. Nakano A. Spinning-disk Confocal Microscopy — A Cutting-Edge Tool for Imaging of Membrane Traffic. Cell Structure and Function. 2002; 27(5):349-55.
21. Díez Guerra FJ. Técnicas de microscopía óptica. Arbor Ciencia Pensamiento Y Cultura. 2004; 698(Febrero):225–258.
22. Becker W. Fluorescence lifetime imaging - techniques and applications. Journal of Microscopy. 2012; 247:119-136.
23. Hirvonen LM, Suhling K. Wide-field TCSPC: Methods and applications. Measurement Science and Technology. IOP Publishing. 2017; 28(1).
24. Miller LM, Dumas P. Chemical imaging of biological tissue with synchrotron infrared light. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes. 2006; 1758:846-857.
25. Byler DM, Susi H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. Biopolymers. 1986; 25(3):469-487.
26. Goormaghtigh E, Ruysschaert J-M, Raussens V. Evaluation of the Information Content in Infrared Spectra for Protein Secondary Structure Determination. Biophysical Journal. 2006; 90(8):2946-2957
27. Sarver RW, Krueger WC. Protein secondary structure from fourier transform infrared spectroscopy: A data base analysis. Analytical Biochemistry. 1991; 194(1):89-100.

28. Miller LM, Dumas P. From structure to cellular mechanism with infrared microspectroscopy. *Current Opinion in Structural Biology*. 2010; 20:649–656.
29. Holman HY, Martin MC, Blakely E a, Bjornstad K, McKinney WR. IR spectroscopic characteristics of cell cycle and cell death probed by synchrotron radiation based Fourier transform IR spectromicroscopy. *Biopolymers*. 2000; 57(6):329-335.
30. Holman HYN, Martin MC, McKinney WR. Synchrotron-based FTIR spectromicroscopy: Cytotoxicity and heating considerations. *Journal of Biological Physics*. 2003; 57(6):329-335.
31. Jamin N, Dumas P, Moncuit J, Fridman W-H, Teillaud J-L, Carr GL, Gwyn PW. Highly resolved chemical imaging of living cells by using synchrotron infrared microspectrometry. *Applied Biological Sciences*. 1998; 95(9): 4837-4840.
32. Terrádez-Gurrea M. Analisis De Componentes Principales. *Revista chilena de obstetricia y ginecolog*. 2006;71(1):1–11.
33. Bosio GN, Parisi J, García Einschlag FS, Mártire DO. Imidazole and beta-carotene photoprotection against photodynamic therapy evaluated by synchrotron infrared microscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2018; 195:53-61
34. Braslavsky SE, Heibel GE. Time-Resolved Photothermal and Photoacoustic Methods Applied to Photoinduced Processes in Solution. *Chemical Reviews*. 1992; 92(6):1381–1410.
35. Braun AM, Maurette MT, Oliveros E. *Photochemical technology*. Wiley; 1991.
36. Ahmed S. Photo electrochemical study of ferrioxalate actinometry at a glassy carbon electrode. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2004; 161(2–3):151–154.

Capítulo 1

Capítulo 1

Efecto de Nanopartículas de Plata estabilizadas con Pectina en la fotofísica de la Riboflavina.

“He aquí mi secreto, que no puede ser más simple: solo se ve bien con el corazón, lo esencial es invisible a los ojos.”

Antoine de Saint-Exupéry

Como se describió en la introducción, en la terapia fotodinámica, el efecto citotóxico de las ROS lleva a la erradicación de tejido no deseado (1). En consecuencia, en la aplicación de esta terapia es deseable emplear fotosensibilizadores con eficiente generación de especies reactivas de oxígeno, que presenten altos coeficientes de absorción y que sean más estables.

Las nanopartículas metálicas presentan un interesante fenómeno conocido como resonancia de plasmones superficiales localizados, cuyo efecto es el aumento de las propiedades radiativas y no radiativas de las nanopartículas (2). Como consecuencia las nanopartículas metálicas, presentan picos de extinción característicos en la región del visible o del NIR, los cuales dependen de su forma y tamaño, así como también de otros factores, como el grado de agregación (3). Este fenómeno es el que las hace muy interesantes, siendo ampliamente utilizadas en el estudio de su influencia sobre las propiedades fotofísicas de los colorantes y las convierte en la base para desarrollar y realizar una amplia gama de aplicaciones tecnológicas, como:

- Espectroscopía Raman de superficie mejorada (4,5).
- Fluorescencia aumentada por RPSL (6).
- Amplificación de señales ópticas no lineales (7).
- Láseres en la nanoescala (8).
- Fotolitografía asistida por plasmón (9,10).
- Fotocatálisis y recolección de luz solar aumentadas por RPSL (11–14).
- Sensores químicos y biológicos ultrasensibles (15–18).

Recientemente se demostró el aumento de producción de oxígeno singlete usando el sensibilizador riboflavina cuando este se encuentra en presencia de nanopartículas de plata estabilizadas con pectina (19). Los mismos autores evidenciaron un aumento en la fluorescencia de la riboflavina en presencia de estas partículas.

Basándonos en estos resultados, decidimos sintetizar y utilizar las PecAgNP para evaluar en detalle los cambios que las mismas podrían generar en la fotofísica de la Rf.

Síntesis de las PecAgNP

Para la síntesis de nanopartículas se utilizó un método previamente descrito en bibliografía (20). Se preparó una solución de 10 g/L de pectina, calentando la misma a 60°C por 45 minutos, asegurando así su completa disolución. Una vez obtenida la solución, se la enfrió hasta llegar a temperatura ambiente y se procedió al agregado de soluciones de AgNO_3 (concentración final 1mM) y de NaOH (concentración final 25mM). La mezcla se dejó en agitación durante 6 horas hasta la obtención de las nanopartículas.

Caracterización de las PecAgNP

Mediante el uso de microscopía electrónica de transmisión pudo verse que las partículas tienen mayoritariamente forma esférica. La observación de una gran cantidad de partículas nos permitió realizar el histograma de distribución de tamaños, mostrado en la Figura 1.1, que arroja como resultado una distribución con un diámetro medio de 2.3 ± 0.7 nm. Estas partículas más pequeñas representan el 95% de la población; el otro 5% está formado por partículas de mayor tamaño cuyo diámetro promedio es de 9 ± 6 nm.

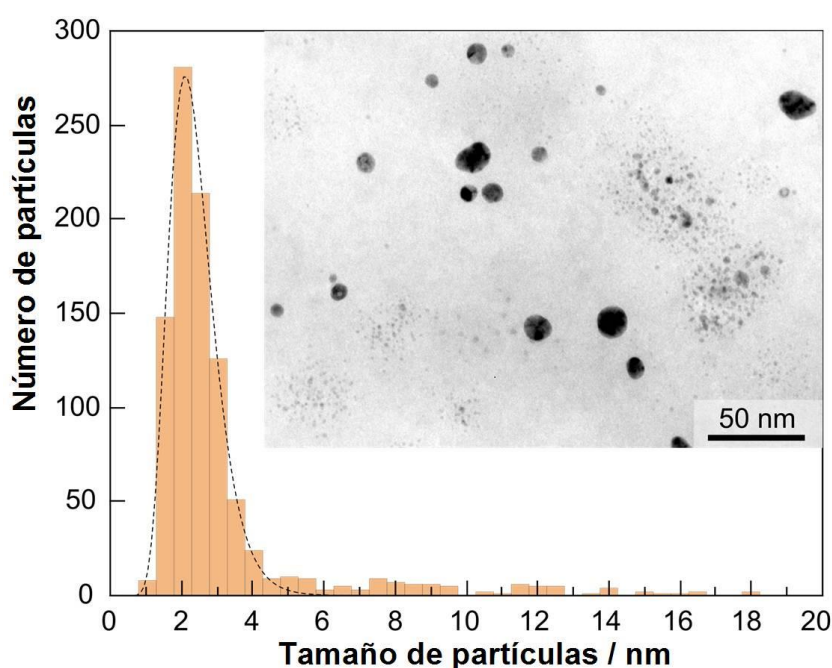


Figura 1.1: Histograma de distribución de tamaños de las PecAgNP. Inset: Fotografía de TEM de las PecAgNP.

Se midió el espectro de absorción UV-Visible de suspensiones acuosas de las nanopartículas que se muestra en la Figura 1.2. La posición del máximo de la banda de resonancia del plasmón de las PecAgNP se encuentra a 414 nm. Además, utilizando una esfera integradora, pudimos establecer que la dispersión acuosa de las partículas no posee prácticamente scattering (dispersión) de luz en el intervalo de longitudes de onda de 240 a 800 nm.

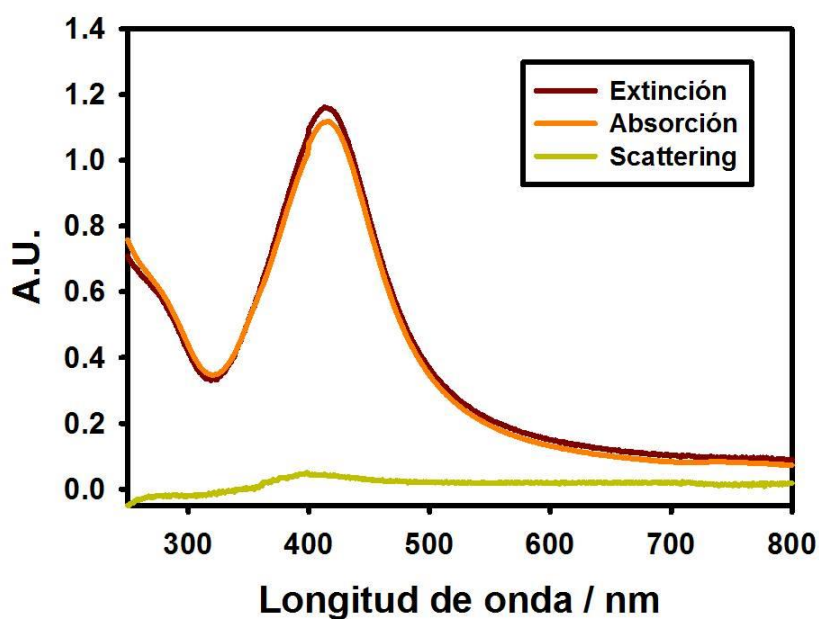


Figura 1.2: Espectros de absorción, extinción y scattering UV-Visible de la dispersión acuosa de PecAgNP que surge de la síntesis.

El valor publicado del punto de carga zero, es decir el pH al cual la carga superficial es cero, para nanopartículas de plata sin cobertura superficial es alrededor de 7 (21). Medidas de potencial Z de la suspensión de nanopartículas en el intervalo de pH entre 4 y 10, nos indican un valor negativo de carga superficial, confirmando el efectivo recubrimiento de la superficie de plata con pectina (Figura 1.3).

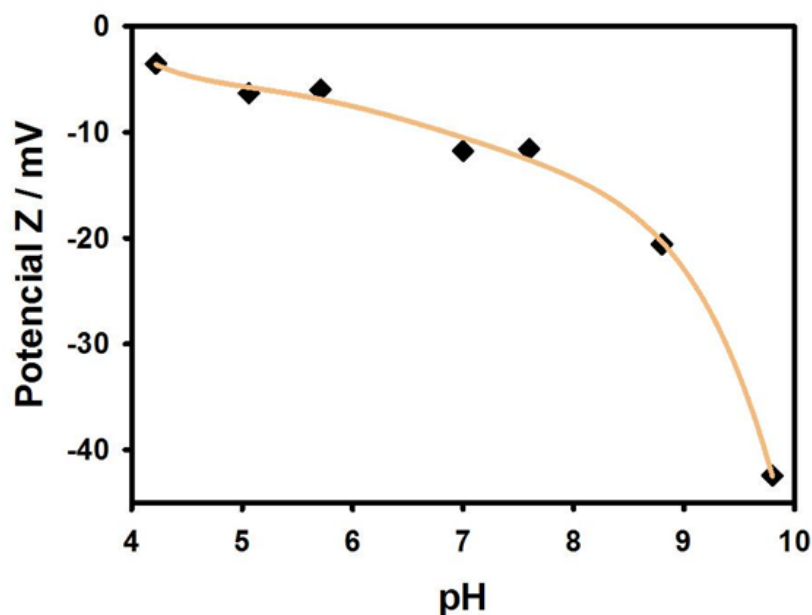


Figura 1.3: Medidas de potencial Z de la suspensión acuosa de PecAgNP que resulta de la síntesis en función del pH.

Este recubrimiento también fue confirmado por comparación de los espectros ATR-FTIR de la pectina y las PecAgNP, los cuales arrojaron las mismas bandas (Figura 1.4). Las medidas fueron realizadas en fase sólida, evaporando el solvente en evaporador rotatorio. Los espectros presentan una banda ancha entre 3600 y 2500 cm^{-1} debida a la vibración de los grupos hidroxilo ($-\text{OH}$), lo que confirma las uniones hidrógeno intra- e intermoleculares (22). Las bandas alrededor de 2950 cm^{-1} ($3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$) surgen de la vibración de los grupos C-H , CH_2 y CH_3 . En la pectina, la banda correspondiente a los grupos C-H se superpone con las bandas O-H que se encuentran entre 2500 y 3600 cm^{-1} . Las fuertes bandas observadas en las regiones de $1760\text{-}1745$ y $1640\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ corresponden a las vibraciones de los grupos C=O y COO^- , respectivamente.

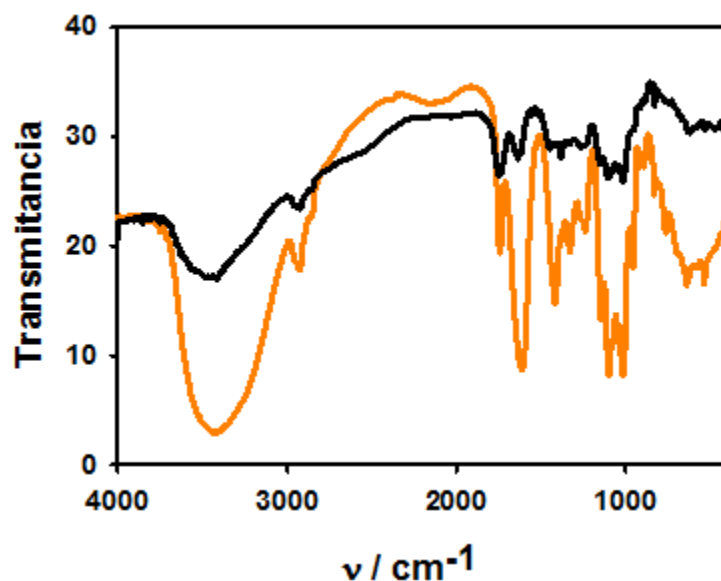


Figura 1.4: Espectro FTIR de la Pectina pura (línea negra) y de las PecAgNP (línea naranja).

Interacción de las PecAgNP con la Riboflavina en estado basal

Las concentraciones de nanopartículas y de Rf utilizadas en los ensayos fotoquímicos, fueron elegidas de manera que la radiación de excitación sea mayormente absorbida por la riboflavina (la absorción de las PecAgNP a la longitud de onda de excitación fue de al menos 10 veces menor que la de la Rf).

De aquí en adelante indicaremos la concentración de Ag en lugar de la concentración de PecAgNP. Nótese que a partir del diámetro medio de las nanopartículas esféricas (2.3 nm) y despreciando la contribución de las nanopartículas más grandes se obtiene un volumen promedio de las nanopartículas de $6.37 \times 10^{-21} \text{ cm}^3$. Tomando el valor de 10.5 g cm^{-3} para la densidad del metal (23) la concentración molar de las nanopartículas es 373 veces menor que la de Ag.

La posible formación de un complejo en estado basal entre la Rf y las PecAgNP fue evaluada mediante espectroscopía de absorción UV-Visible, en condiciones similares a las empleadas luego en los ensayos fotoquímicos.

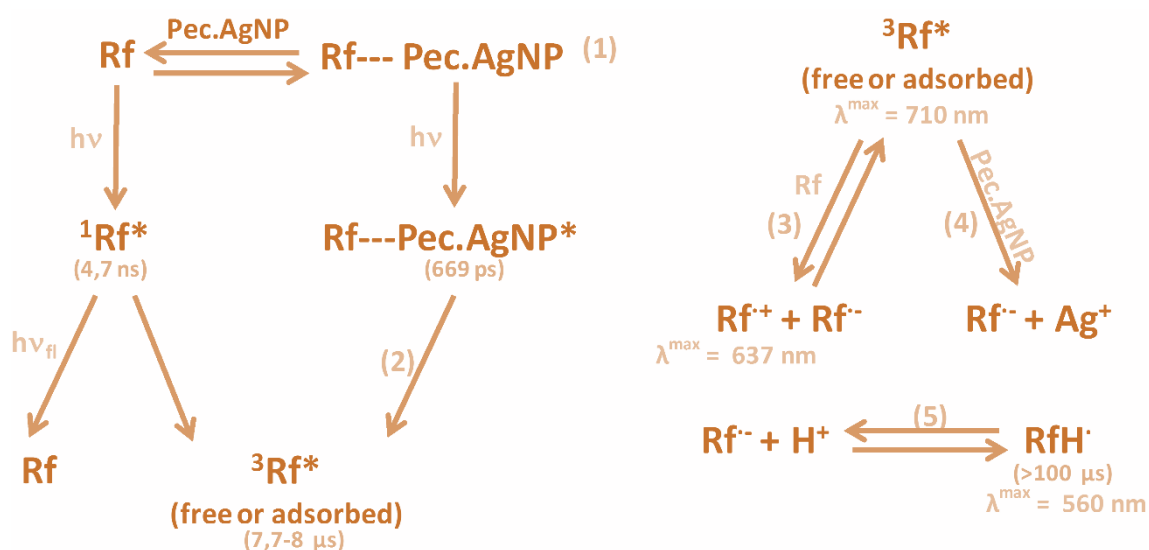
Antes de realizar algún cálculo, nos aseguramos de que exista un cambio verdadero en los espectros de absorción de la mezcla de Rf y PecAgNP, con respecto a la suma de los espectros de la Rf y las PecAgNP por separado.

La Figura 1.5 muestra los espectros de absorción UV-Visible obtenidos en ensayos con riboflavina ($[Rf] = 0.54 \mu\text{M}$) y suspensiones de PecAgNP ($[Ag]$ entre 0 y $7.88 \mu\text{M}$).

La constante aparente de equilibrio de formación de un complejo entre la Rf y las PecAgNP fue determinada según el método reportado por Benesi y Hildebrand (24), el cual tiene en cuenta la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{A_{obs} - A_0} = \frac{1}{A_c - A_0} + \frac{1}{K_{app}(A_c - A_0)[Ag]} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

Donde: A_{obs} es la absorbancia observada a 440 nm de las muestras de Rf con diferentes concentraciones de PecAgNP; A_0 y A_c son las absorbancias de la Rf y del complejo a 440 nm.



Esquema 1.1: Distintos pasos del mecanismo de reacción propuesto para la interacción de Rf con PecAgNP.

En el recuadro de la Figura 1.5 se muestra la gráfica de $(A_{obs}-A_0)^{-1}$ vs $[Ag]$ a partir de la cual puede obtenerse el valor de la K_{app} : $(2.8 \pm 0.3) \times 10^4$ M⁻¹, permitiéndonos corroborar la formación de un complejo entre la Rf y las nanopartículas en estado basal (ver reacción (1) del Esquema 1.1).

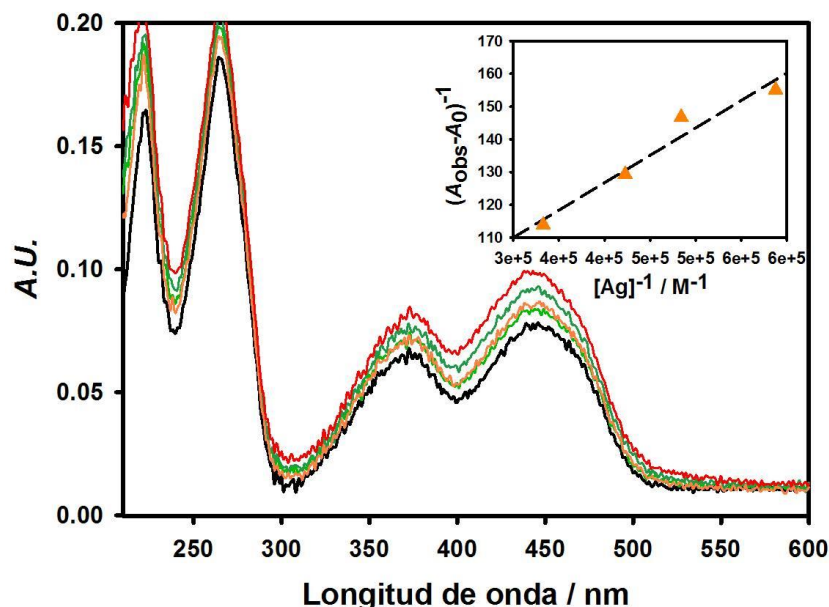


Figura 1.5: Espectros de absorción UV-Visible de Rf en ausencia (negro) y presencia de varias cantidades de PecAgNP: 0.79 μM (verde claro), 1.18 μM (naranja), 1.57 μM (verde oscuro) y 7.88 μM (rojo). Inset: Gráfico de $(A_{\text{obs}} - A_0)^{-1}$ vs $[\text{Ag}]^{-1}$

Estos datos indican que la cantidad de Rf complejada en los ensayos que se mostrarán a continuación es baja: $\leq 4\%$ en la determinación de tiempos de vida, $\leq 5\%$ en espectroscopía de absorción de transientes con $\lambda^{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$ y $\leq 14\%$ en los experimentos de LFP con $\lambda^{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$.

Efecto de las PecAgNP en la fluorescencia de la Riboflavina

Se midió el tiempo de vida de fluorescencia de la Rf en suspensiones con distintas concentraciones de PecAgNP. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.1. El tiempo de vida de fluorescencia permaneció constante en todas las muestras igual a $4.7 \pm 0.1 \text{ ns}$, muy similar a los valores reportados en bibliografía para Rf en agua (25). Esto descarta la idea de que pueda existir un proceso de quenching (desactivación del estado excitado) colisional o una transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, del inglés: Förster resonance energy transfer) (26).

[Ag] / μM	τ / ns
0	4,73
0,046	4,75
0,068	4,75
0,079	4,73
0,091	4,75
0,118	4,72
0,158	4,72
0,455	4,75
0,683	4,68
0,788	4,72
0,911	4,69
4,55	4,73

Tabla 1.1: Tiempos de vida de fluorescencia de la RF en presencia de distintas concentraciones de PecAgNP.

Se registraron los espectros de emisión de Rf (16 μM) en presencia de diferentes cantidades de PecAgNP ($\lambda^{\text{exc}} = 420 \text{ nm}$). Para poder determinar cuál es el efecto de la adición de las nanopartículas debemos descartar los posibles efectos de filtro interno tanto a las longitudes de onda de λ^{exc} y λ^{em} . Estos efectos se tuvieron en cuenta corrigiendo la intensidad registrada a cada longitud de onda de emisión mediante la Ecuación 1.2:

$$F_{\text{cor}} = F_{\text{obs}} 10^{(Abs_{\text{exc}} + Abs_{\text{em}}) / 2} \quad \text{Ecuación 1.2}$$

Donde F_{cor} e F_{obs} son respectivamente las intensidades de emisión corregidas y medidas, Abs_{exc} y Abs_{em} son respectivamente las absorbancias de PecAgNP a λ^{exc} y λ^{em} y el factor 2 supone que la absorción y la emisión tienen lugar en el centro de la celda.

Los resultados se presentan en la Figura 1.6, en la que puede observarse un modesto efecto de quenching.

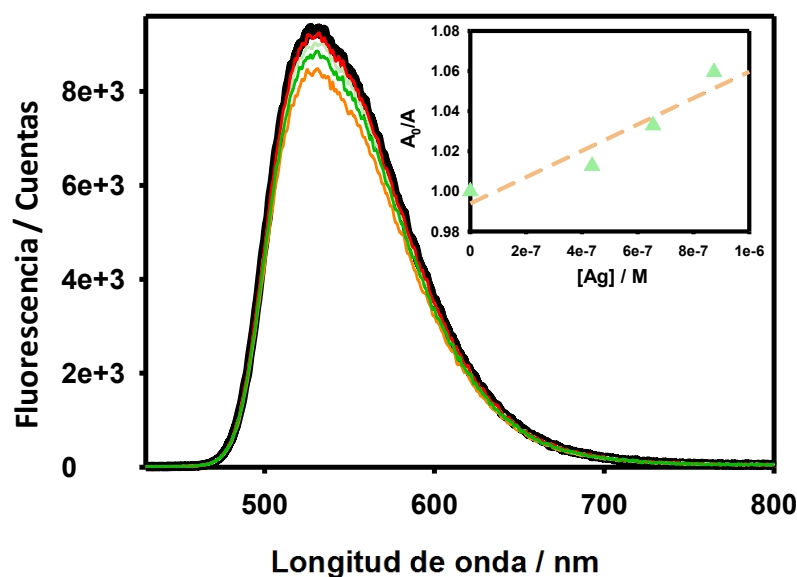


Figura 1.6: Espectro de emisión de fluorescencia de la Rf (16μM) en ausencia (negro) y presencia de distintas cantidades de PecAgNP. Las concentraciones de Ag son: 4.37 μM (rojo), 0.87 μM (verde claro), 0.65 μM (verde oscuro), 0.44 μM (naranja). Inset: Gráfico de (A_0/A) vs. $[Ag]$. A_0 y A son las áreas de emisión corregidas sin y con nanopartículas, respectivamente.

El aumento de absorbancia de Rf en presencia de las nanopartículas, que ocurre prácticamente en todo el intervalo de longitudes de onda evaluado (Figura 1.5), podría deberse solamente a un fenómeno de excitación aumentada (26), sin que haya complejación entre la Rf y PecAgNP. Si los efectos observados en la Figura 1.5 se debieran únicamente a absorción aumentada, deberíamos esperar un aumento en la intensidad de fluorescencia de Rf en presencia de PecAgNP sin afectar el tiempo de vida de emisión. Sin embargo, vemos el efecto opuesto en la intensidad de emisión (Figura 1.6), lo que conjuntamente con la constancia en el tiempo de vida (Tabla 1.1) son consistentes con la formación de un complejo no fluorescente entre Rf y las nanopartículas. Esta hipótesis está apoyada por los resultados de espectroscopía de absorción de transientes mostrados más adelante, que son compatibles con la formación de un complejo entre el sensibilizador y las nanopartículas.

Experimentos de Pump-Probe

Los experimentos de Pump-Probe constituyen el método más simple utilizado para estudiar dinámicas electrónicas ultrarrápidas. En esta técnica, se utilizan pulsos de láser ultracortos para excitar la muestra (haz de bombeo), generando una distribución de estados no equilibrada, y para analizar los cambios inducidos por el bombeo en las constantes ópticas de la muestra (haz de análisis). La medición de los cambios en las constantes ópticas en función del tiempo de demora entre la llegada del haz de bombeo

y los pulsos del haz de la sonda produce información sobre la relajación de los estados electrónicos en la muestra.

Para estos experimentos, la longitud de onda de excitación fue de 400 nm y los mismos fueron realizados bajo atmósfera saturada de Ar.

Para nanopartículas metálicas, el haz de bombeo excita selectivamente los electrones, y el gas de electrones formado alcanza temperaturas de hasta varios miles de grados Kelvin, dependiendo de la intensidad del haz de bombeo. La excitación de los electrones por un pulso láser de femtosegundo produce una perturbación en la distribución electrónica del metal. Esta distribución electrónica termaliza, es decir relaja la energía inicial absorbida por un fotón mediante los procesos de scattering electrón-electrón y las interacciones electrón-fonón y fonón-fonón (27,28). Los espectros diferencia para nanopartículas, muestran el bleaching (disminución de la población del estado fundamental) centrado en el máximo de la banda de resonancia del plasmón con dos bandas de absorción positivas a más bajas y más altas longitudes de onda como se ve en la Figura 1.7 reproducida del trabajo de Ahmadi et al. (29).

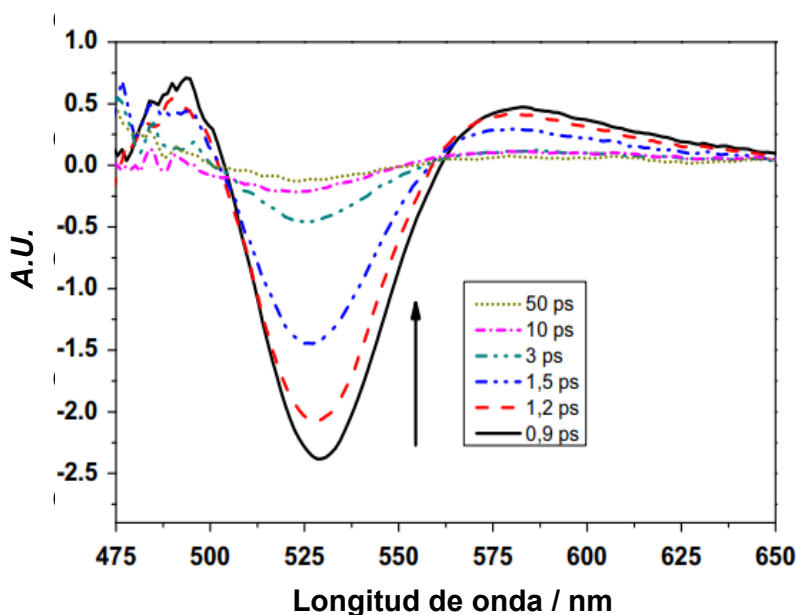


Figura 1.7: Espectros de absorción de transientes de nanopartículas de oro coloidales que muestran la recuperación del bleaching del estado basal en función del tiempo de demora entre los pulsos de la bomba y de análisis (29).

La Figura 1.8 (a), muestra los EADS obtenidos para los experimentos con PecAgNP en ausencia de Rf. Para los dos tiempos de decaimiento más cortos (0.32 y 3.93 ps), se observan las bandas de absorción de mayores longitudes de onda mencionadas anteriormente. El scattering electrón-electrón (normalmente en el orden de los 10 fs (30)) no se observa por el tiempo de resolución del experimento (~ 150 fs). El tiempo de decaimiento de 0.32 ps está asociado a la relajación electrón-fonón. El efecto fonón-fonón se encuentra en el orden de cientos de ps para nanopartículas metálicas (27), y es por eso que el valor de 203 ± 10 ps fue asignado a este fenómeno. Los tiempos de decaimiento fueron independientes de las concentraciones de PecAgNP utilizadas.

En la Figura 1.8 (b), se muestran los EADS obtenidos solo para Rf. Debemos tener en cuenta que el estado S_1 de la Rf tiene una energía de 2.48 eV, y como nosotros estamos trabajando a 400 nm (3.10 eV) (31), nuestro espectro mostrado en la Figura 1.8 (b) fue obtenido con un exceso de energía de 0.6 eV. El EADS correspondiente al tiempo de decaimiento más corto (825 ± 41 fs), muestra señales $S_0 \rightarrow S_1$ negativas (bleaching) por debajo de ~ 560 nm, y absorciones de estados excitados (AES) $S_1 \rightarrow S_n$ por encima de esta longitud de onda. Esto concuerda con los datos obtenidos por Weigel et al. (32), quienes observaron un decaimiento biexponencial con un espectro similar con tiempos de vida de 0.2 y 1.1 ps. El componente de 4.7 ± 0.2 ns, que también muestra un bleaching y la fluorescencia $S_1 \rightarrow S_0$ en la forma de emisión estimulada ($\lambda < 580$ nm), es asignado al decaimiento $S_1 \rightarrow S_0$, en concordancia con el tiempo de vida medido de emisión en este trabajo de tesis (Tabla 1.1). Este decaimiento contiene además contribuciones de especies que no logran decaer en la ventana de tiempo experimental (~ 5 ns), como el estado triplete de la riboflavina obtenido por cruce entre sistemas desde el estado S_1 . La componente de 21 ± 1 ps en nuestro caso, y de 100 ps en el trabajo de Weigel, es visible en toda la ventana espectral con muy pequeña amplitud. Weigel et al. proponen que los espectros asociados a este tiempo de decaimiento corresponden a la absorción de estados excitados ($S_1 \rightarrow S_n$) a 300 nm (región no analizada en esta tesis), junto con las regiones que presentan bleaching, sugiriendo que la población de Rf que se encuentra en ese estado excitado, lo abandona dirigiéndose a otros estados que se encuentran más accesibles, y finalmente retornando a su estado basal.

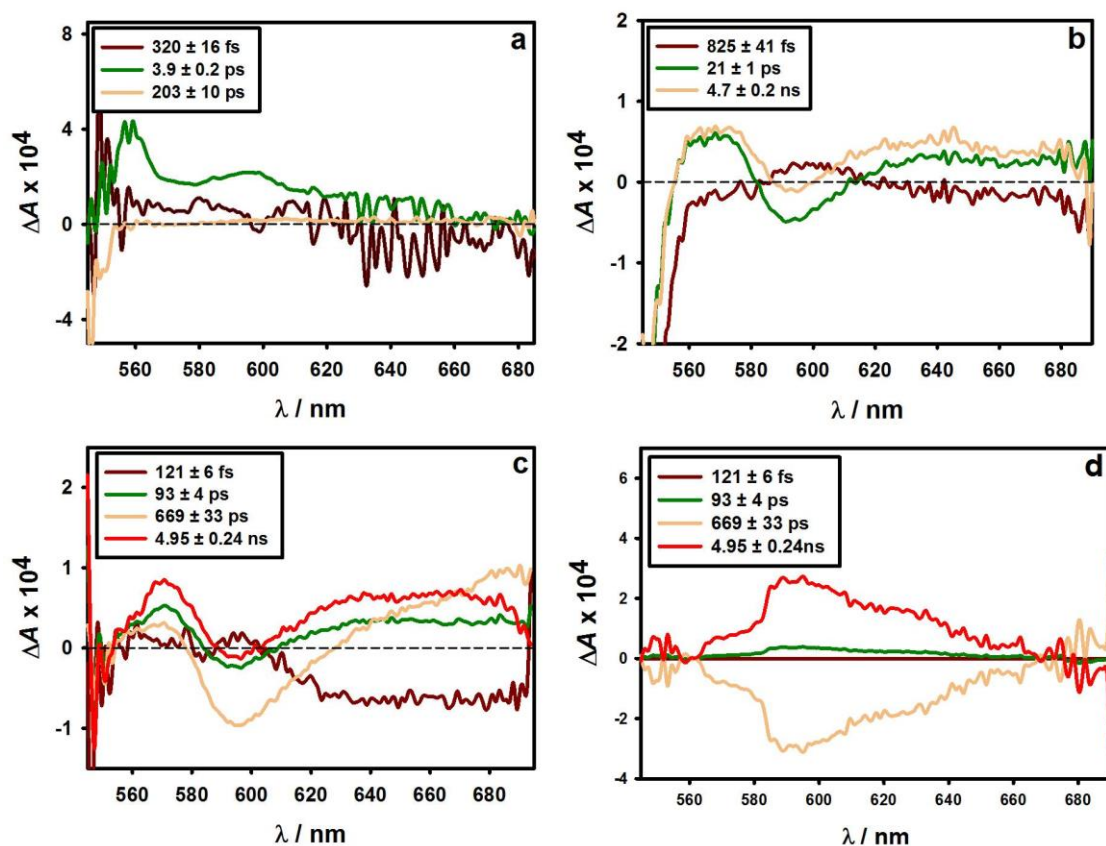


Figura 1.8: Comparación de los espectros de los transientes obtenidos en los experimentos de pump-probe: (a) EADS de las suspensiones de PecAgNP 1.8 μ M en Ag; (b) EADS de una solución de Rf (53 μ M) sin PecAgNP; (c) EADS de una solución de Rf (53 μ M) en presencia de 1.8 μ M en Ag; (d) DADS correspondiente a los EADS mostrados en (c).

Las Figura 1.8 (c) y (d), muestran los EADS y DADS obtenidos para Rf en presencia de PecAgNP. Cuatro componentes fueron necesarias para realizar este análisis. Recordemos que los espectros DADS se interpretan en términos de la pérdida o ganancia de absorción asociada a un cierto tiempo de vida, mientras que los espectros EADS representan la evolución espectral: por ejemplo, un segundo EADS crece con el primer tiempo de vida y decae con el segundo.

La Figura 1.8 (c), muestra un EADS con un tiempo de decaimiento de 121 \pm 6 fs, que no se encuentra presente ni en los experimentos realizados para la solución de Rf sola o de PecAgNP solas. El mismo, no surge del estado S_1 de la Rf. Sin embargo, dado que el tiempo de decaimiento de 121 \pm 6 fs está dentro del tiempo de resolución de los experimentos (aproximadamente 150 fs), el espectro podría tener contribuciones de fenómenos ultrarrápidos tales como artefactos coherentes (33), y por lo tanto, no puede obtenerse información confiable de este EADS.

La comparación de los espectros de la Figura 1.8 (a) y (b), muestra que la región de emisión estimulada de Rf se solapa con la de los tiempos de decaimiento más cortos

de las PecAgNP. Por lo tanto, podemos pensar que la transferencia de energía del complejo al plasmón de las nanopartículas alteraría la distribución de electrones en el plasmón, el cual se relaja con un tiempo de decaimiento de 93 ± 4 ps, como puede verse en la Figura 1.8 (c) y (d).

Los EADS de los dos tiempos de decaimiento más lentos (669 ± 33 ps y 4.95 ± 0.24 ns) se ven muy similares (Figura 1.8 (c)). El DADS de 669 ± 33 ps refleja la imagen de los DADS de 4.95 ± 0.24 ns en todo el rango de 540 a 700 nm (Figura 1.8 (d)). Esto sugiere fuertemente que la especie con el tiempo de decaimiento de 669 ± 33 ps alimenta a la especie con el tiempo de decaimiento de 4.95 ± 0.24 ns. El mismo argumento en los análisis de DADS fue usado para proponer un mecanismo secuencial para la reacción de transferencia electrónica del triptófano al grupo hemo en las mioglobinas ferrosas (34). Proponemos entonces, que el estado excitado del complejo formado entre la Rf y las PecAgNP, con un tiempo de vida de 669 ± 33 ps decae a un estado cuyo decaimiento es mucho más lento que la ventana temporal del experimento. El espectro con decaimiento de 4.95 ± 0.24 ns no puede asignarse a ninguna especie porque está dentro del margen de la ventana temporal del experimento.

Dado que la fracción de Rf complejada es menor a 5% en estos ensayos (ver arriba), el hecho de que podemos obtener evidencia de la formación del complejo en ensayos de espectroscopía de absorción de transientes significa que el complejo presenta un alto coeficiente de absorción, probablemente debido a una interacción de transferencia de carga.

Experimentos de Láser Flash Fotólisis

Los experimentos de LFP para este sistema fueron realizados bajo atmósfera de Ar y con dos equipos diferentes: con uno se excitaron las muestras a 400 nm y con el otro a 355 nm.

LFP con $\lambda^{\text{ex}} = 400$ nm: A los espectros obtenidos en estas medidas, tanto en presencia como en ausencia de PecAgNP, se les realizó un ajuste con 4 componentes.

En la Figura 1.9 pueden observarse los EADS obtenidos para la componente más rápida (5.0 ns) para la muestra de Rf que no contiene PecAgNP; estos cambios de absorbancia son positivos por debajo de 480 nm y negativos por encima de esta longitud de onda. Esta componente, por lo tanto, puede ser asignada al estado S_1 de la Rf, el cual muestra una absorción del estado excitado por debajo de 480 nm que luego da lugar al primer estado excitado triplete de la Rf, que presenta un máximo de absorción a 710 nm (35). La asignación de esta componente al estado S_1 de la Rf está de acuerdo con el tiempo de vida de fluorescencia medido en los ensayos de TCSPC (4.7 ns) en presencia y ausencia de PecAgNP. Por esta razón se estableció este valor para el tiempo de vida

del decaimiento más corto de las muestras que contienen PecAgNP. En este procedimiento de ajuste, se necesitaron cinco componentes. Como puede verse en la Figura 1.9, el EADS de la componente 4.7 ns de Rf en presencia de partículas se ve muy diferente al obtenido en su ausencia. Los EADS en presencia de las PecAgNP tienen una contribución principal del estado triplete de Rf, en concordancia con la población de este estado desde el estado excitado del complejo formado entre la Rf y las PecAgNP. Por lo tanto, la absorción del estado S_1 del Rf libre está enmascarada por la de $^3Rf^*$, que tiene coeficientes de absorción mayores y mayores tiempos de vida. También se observa un bleaching por debajo de 480 nm debido a que la absorción del estado de triplete es mucho menor que la del estado fundamental. Estos datos indican que el complejo excitado decae al estado triplete de la Rf (ver reacción (2) en el Esquema 1.1). Como el coeficiente de absorción del estado triplete de la Rf es mayor, el decaimiento del estado excitado del complejo al estado fluorescente S_1 de la Rf no puede descartarse según estos experimentos. Sin embargo, el quenching de fluorescencia que se muestra en la Figura 1.6 no es compatible con esta ruta de des población del estado.

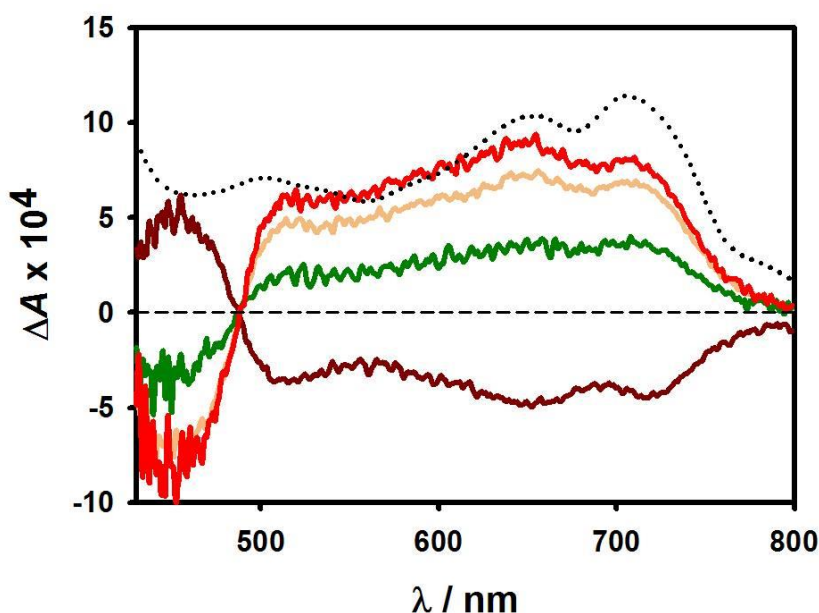


Figura 1.9: EADS obtenidos luego de la excitación de Rf (53 μ M) en ausencia (línea marrón) y presencia de 0.87 μ M de Ag (línea verde), 2.2 μ M de Ag (línea naranja) y 4.4 μ M de Ag (línea roja). La línea punteada muestra un espectro de absorción triplete-triplete de la Rf obtenido de literatura (36).

La segunda componente del ajuste es asignada al estado triplete de la Rf. El tiempo de vida de este estado es de $7.7 \pm 0.7 \mu$ s y es independiente de la concentración de las PecAgNP. Nuevamente un bleaching se observa por debajo de 480 nm por las mismas razones explicadas anteriormente (ver Figura 1.10).

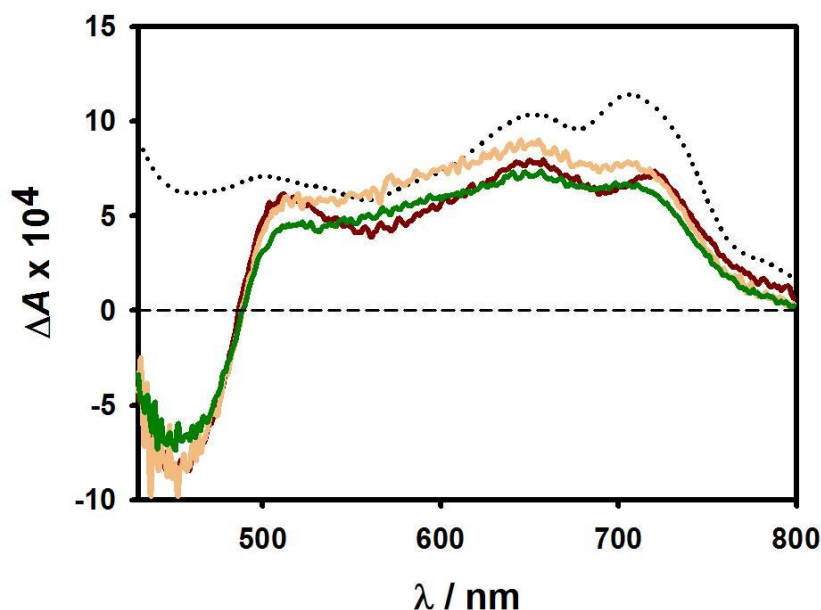
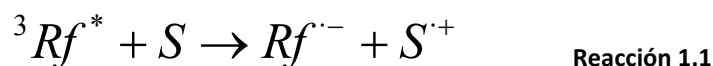


Figura 1.10: EADS obtenidos para los tiempos de 7.7 μ s luego de la excitación de Rf (53 μ M) en ausencia (línea marrón) y presencia 2.2 μ M de Ag (línea verde) y 4.4 μ M de Ag (línea naranja). La línea punteada muestra un espectro de absorción triplete-triplete de la Rf obtenido de literatura (36).

Estudios de LFP de soluciones de Rf muestran que puede ocurrir la siguiente Reacción 1.1 (36):



Donde S es un donador de electrones (36). Esta reacción ocupa un lugar muy importante en la fotoquímica de la Rf, ya que muchas moléculas biológicas son capaces de actuar como donoras de electrones (36).

El cambio de energía estándar de Gibbs $\Delta_{ET}G^\circ$ para la reacción de transferencia de carga anterior, puede ser calculada con la Ecuación 1.3, la cual incluye el potencial redox (E°) del aceptor (${}^3Rf^*$), del donador (S), y la energía del triplete de la Rf, $\Delta E_{0,0}$ en $J \cdot mol^{-1}$. N_A es la constante de Avogadro y e es la carga del electrón.

$$\Delta_{ET}G^\circ = N_A(eE^\circ(S^+/S) - eE^\circ({}^3Rf^*/Rf^{\cdot-})) - \Delta E_{0,0} \quad \text{Ecuación 1.3}$$

Para los cálculos de $\Delta_{ET}G^\circ$ utilizaremos los valores reportados para $E^\circ({}^3Rf^*/Rf) = -0.546$ V vs NHE (37) y de $\Delta E_{0,0} = 209$ $kJ \cdot mol^{-1}$ (31).

En particular, el estado basal de la Rf puede actuar como un donador de electrones (ver la reacción (3) en el Esquema 1.1). En medio acuoso, $Rf^{\cdot-}$ es convertido rápidamente al radical semiquinona $RfH^{\cdot-}$ (ver la reacción 5 en esquema 1.1) (38). Para un valor de

$E^\circ(\text{Rf}^{+}/\text{Rf})=2.28\text{ V}$ (39), se obtiene un valor de $\Delta_{\text{ET}}G^\circ=63.3\text{ kJmol}^{-1}$ para la reacción (3). Este es un valor positivo, pero bajo de $\Delta_{\text{ET}}G^\circ$. Para muchas reacciones, valores de $\Delta_{\text{ET}}G^\circ$ de estas características indican la reversibilidad del proceso de transferencia de electrones (40).

Para verificar si las PecAgNP pueden actuar como donoras de electrones según la reacción (4) del Esquema 1. 1 se calculó $\Delta_{\text{ET}}G^\circ$ mediante la Ecuación 1.3, teniendo en cuenta que S^+ es Ag^+ y S es Ag en nuestro sistema.

Tomando el valor de potencial redox $E^\circ(\text{Ag}^+/\text{Ag}) \sim 0.78\text{ V}$ (41) para nanopartículas de plata de 10 nm de diámetro, se obtiene un valor de $\Delta_{\text{ET}}G^\circ= -81.2\text{ KJmol}^{-1}$, lo que confirma que este proceso es posible (ver reacción (4) en esquema 1.1).

En la Figura 1. podemos ver los EADS correspondientes a la tercera componente. El tiempo de vida de la tercera componente del ajuste, en ausencia de PecAgNP fue de $24.1\text{ }\mu\text{s}$. En presencia de nanopartículas, este tiempo de vida fue de $18 \pm 2\text{ }\mu\text{s}$, independientemente de la concentración de PecAgNP. Dos especies contribuyen a este espectro: el radical neutro RfH^\cdot (formado a partir de las reacciones (3) y (4) luego de la protonación de Rf^\cdot (reacción (5)) y el radical catión Rf^{+} .

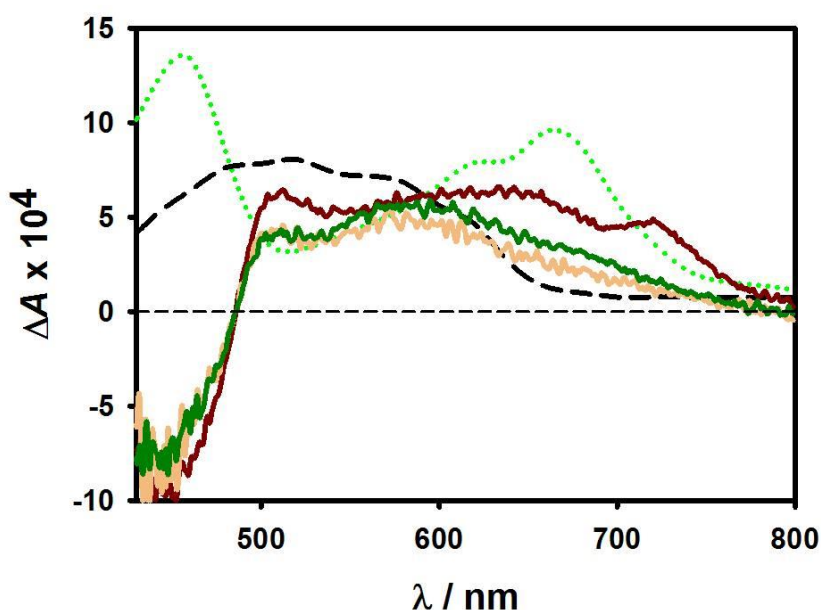


Figura 1.11: EADS obtenidos para la tercer componente (rango de $20\text{ }\mu\text{s}$) en ausencia (línea marrón) y presencia $1.3\text{ }\mu\text{M}$ de Ag (línea verde) y $4.4\text{ }\mu\text{M}$ de Ag (línea naranja). La línea punteada verde muestra el espectro del radical Rf^{+} y la línea rayada negra el del radical RfH^\cdot obtenido de literatura (36).

En la Figura 1., puede verse claramente que la contribución de $\text{Rf}^{\cdot+}$ en ausencia de PecAgNP es más relevante, como era de esperar por la competencia de las reacciones (3) y (4) en presencia de las nanopartículas (esquema 1.1).

La cuarta componente, con un tiempo de vida de $530 \pm 27 \mu\text{s}$ en ausencia y de $257 \pm 46 \mu\text{s}$ en presencia de PecAgNP es asignada al radical RfH^{\cdot} (libre o adsorbido) por comparación con el espectro reportado en la literatura (Figura 1.12).

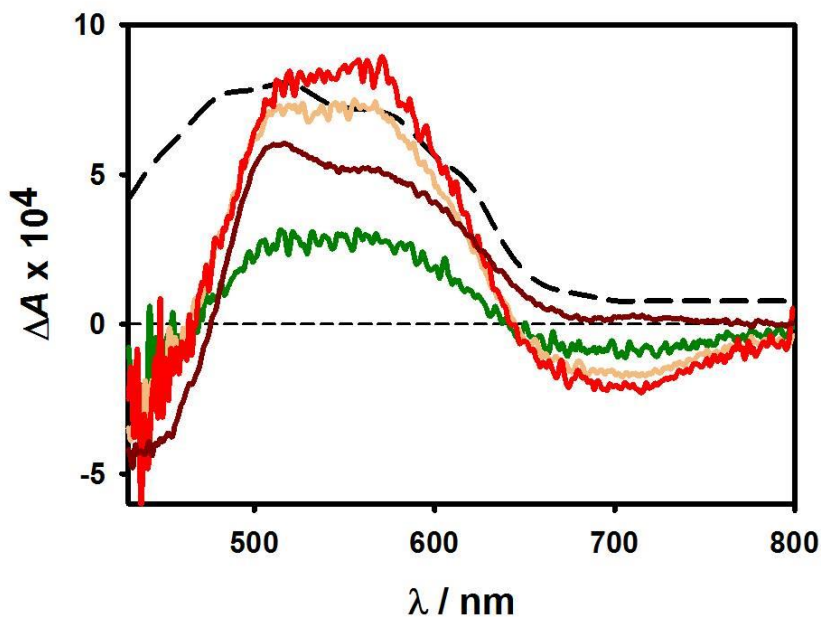


Figura 1.12: EADS obtenidos para la cuarta componente en ausencia (línea marrón) y presencia de $0.87 \mu\text{M}$ de Ag (línea verde), $2.2 \mu\text{M}$ de Ag (línea naranja) y $4.4 \mu\text{M}$ de Ag (línea roja). La línea rayada negra muestra el espectro de RfH^{\cdot} obtenido de literatura (15).

LFP con $\lambda^{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$: Dado que la absorbancia de las nanopartículas es menor a 355 nm que a 400 nm , estos experimentos permitieron aumentar la concentración de PecAgNP utilizada, manteniendo una relación de absorbancia entre Rf y PecAgNP de 10:1 o superior para que la mayoría de los fotones fueran absorbidos por el colorante. El tiempo de la ventana espectral de estos experimentos es de 1 a $200 \mu\text{s}$.

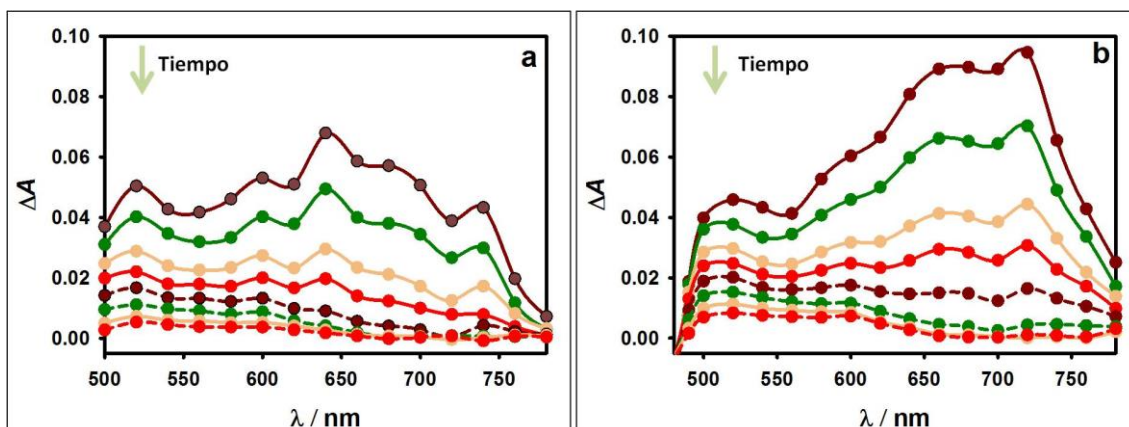


Figura 1.13: Espectros de absorción obtenidos en los experimentos de LFP ($\lambda^{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$) de una solución de Rf ($57 \mu\text{M}$) en ausencia (a) y presencia (b) de $7.88 \mu\text{M}$ de PecAgNP, tomados a diferentes tiempos luego del pulso del láser (100, 50, 25, 15, 10, 5 y $2 \mu\text{s}$)

La comparación de los espectros obtenidos en las Figura 1.13 (a) y (b), muestra que la absorbancia en el máximo de absorción del espectro del triplete de la Rf (710nm), es mayor en los ensayos que contienen PecAgNP, en concordancia con los resultados de pump-probe y LFP realizados a $\lambda^{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$. Como los espectros de $^3\text{Rf}^*$, RfH^\cdot y Rf^+ , se encuentran solapados y todos decaen en los microsegundos, se realizó un análisis global de los mismos empleando un programa llamado ASUfit (42) (en este caso no pudo emplearse el programa Glotaran por la forma en la que habían sido almacenados los datos).

Todos los espectros pudieron ser ajustados con tres componentes de tiempos de vida $8 \pm 1 \mu\text{s}$, $35 \pm 6 \mu\text{s}$ y $205 \pm 31 \mu\text{s}$, en total concordancia con los experimentos realizados con longitud de onda de excitación a 400 nm .

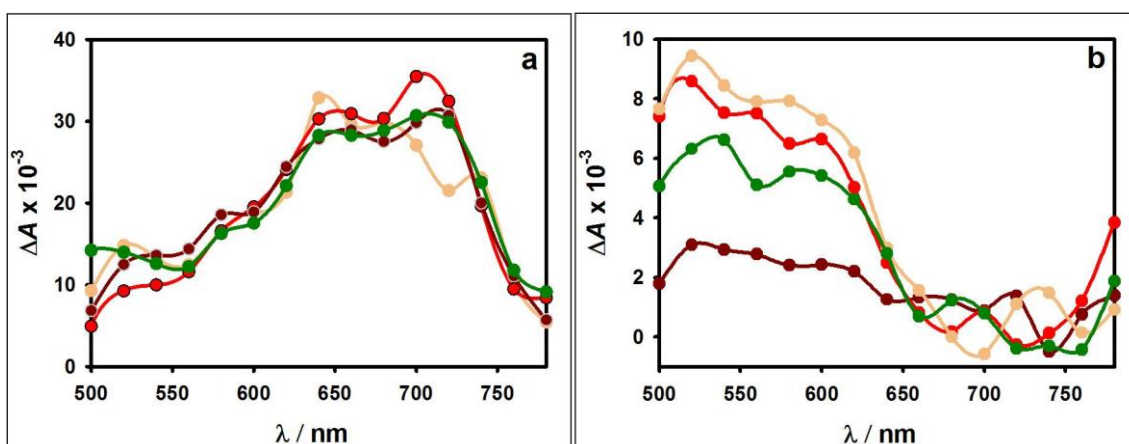


Figura 1.14: DADS correspondientes a $8 \pm 1 \mu\text{s}$ (a) y $205 \pm 31 \mu\text{s}$ (b) obtenidos en los experimentos de LFP ($\lambda^{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$) para una solución de $[\text{Rf}] = 57 \mu\text{M}$ en ausencia (marrón) y presencia de PecAgNP: $1.18 \mu\text{M}$ (verde), $1.57 \mu\text{M}$ (naranja) y $7.88 \mu\text{M}$ (rojo) de Ag.

En la Figura 1.14 (a) observamos que las especies obtenidas a tiempos cortos, coinciden con el espectro reportado para el $^3\text{Rf}^*$ (35,36). El tiempo de decaimiento del $^3\text{Rf}^*$ es independiente de la presencia de distintas cantidades de PecAgNP, concordando con los experimentos de LFP con $\lambda^{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$.

El componente con tiempo de decaimiento de $35 \pm 16 \mu\text{s}$ (DADS no mostrado) se forma a través del decaimiento de $^3\text{Rf}^*$ y presenta contribuciones de RfH^\cdot y $\text{Rf}^{+\cdot}$.

El DADS para la tercera componente ($205 \pm 31 \mu\text{s}$) se muestra en la Figura 1.14 (b). El mismo es coincidente con el espectro de absorción informado para RfH^\cdot (36).

Los experimentos de LFP a las dos longitudes de onda de excitación no dieron evidencia de un acortamiento del tiempo de vida de $^3\text{Rf}^*$ (ca. $8 \mu\text{s}$) por la presencia de las nanopartículas, a pesar de que la transferencia de carga desde Ag al triplete de sensibilizador es un proceso termodinámicamente favorable (ver más arriba). Esto puede deberse a las bajas concentraciones de nanopartículas usadas para minimizar su absorción de luz y al hecho de que la reacción (3) sea más rápida que la (4) (ver Esquema 1.1). Esto último significa que $k_3 \times [\text{Rf}] \geq k_4 \times [\text{Ag}]$. El valor publicado para k_3 es $6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (43) y $[\text{Rf}] = 53 \mu\text{M}$, por lo que resulta $k_3 \times [\text{Rf}] = 3,18 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$. Debido a que la fracción de Rf adsorbida es baja consideraremos la reacción entre $^3\text{Rf}^*$ libre y las nanopartículas. La concentración de $[\text{Ag}]$ en estos ensayos es $\leq 4.4 \mu\text{M}$. Un límite superior para la constante de velocidad k_4 puede estimarse mediante la ecuación de Smoluchowski (44) considerando la difusión de $^3\text{Rf}^*$ a la superficie de la nanopartícula. El valor obtenido de esta forma es $2.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, por lo que $k_4 \times [\text{Ag}] \leq 119 \text{ s}^{-1}$ y se cumple que $k_3 \times [\text{Rf}] \geq k_4 \times [\text{Ag}]$.

Para poder cuantificar el incremento del rendimiento de formación del estado triplete de la Rf en presencia de nanopartículas, se graficó la relación entre los cambios de absorbancias a 710 nm a un tiempo de $1 \mu\text{s}$ (ΔA^{710}) en presencia de nanopartículas y en ausencia de las mismas (ΔA^{710}_0) obtenidos de los experimentos de LFP tanto excitando a 355 nm como a 400 nm , vs. la concentración de Ag. Este gráfico se muestra en la Figura 1.6, y podemos observar que el crecimiento del triplete es independiente de la longitud de onda de excitación y que un incremento, dentro del error experimental, próximo al 100% en el rendimiento de formación del triplete se obtiene en presencia de la máxima concentración de PecAgNP. Debemos tener en cuenta que el rendimiento de triplete (ϕ_T) de Rf en agua es 0,6 (36) según estos datos obtendríamos un valor de ($\phi_T \sim 1$).

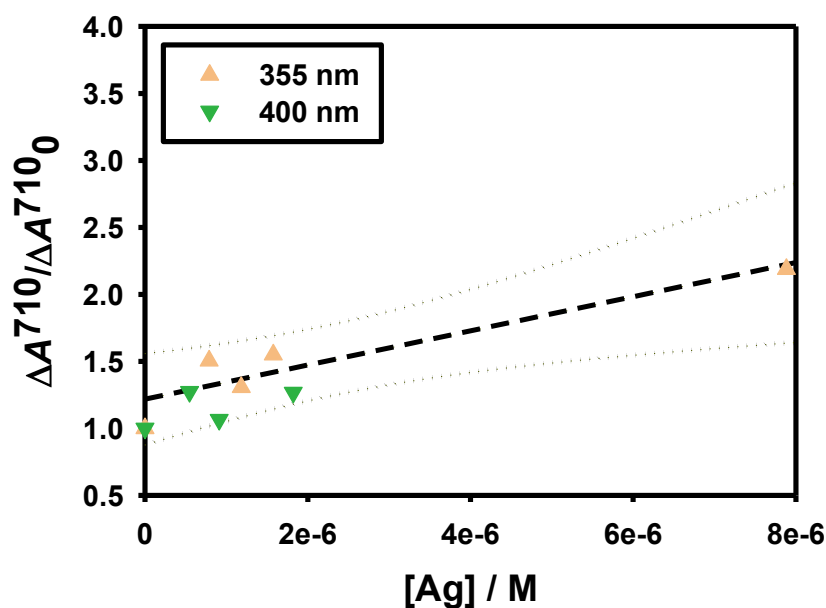
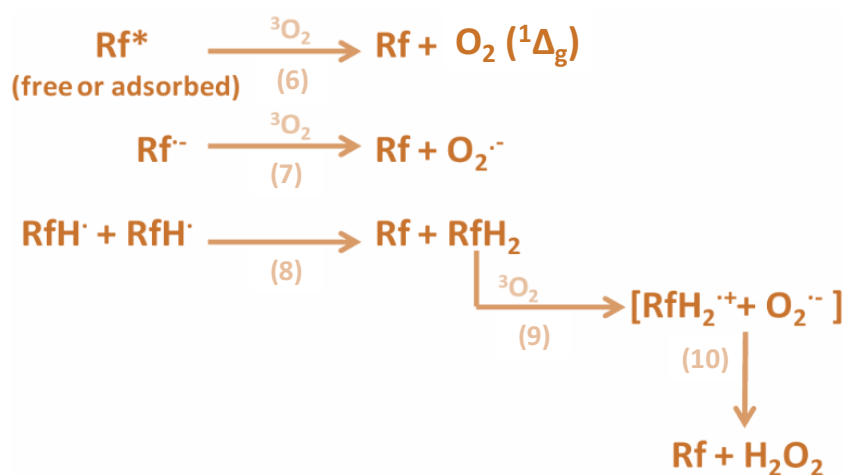


Figura 1.6: Gráfico de $\Delta A^{710}/\Delta A^{710}_0$ vs $[Ag]$.

Efecto de las PecAgNP en la generación de ROS por parte de la Rf

En condiciones aeróbicas, la transferencia de energía de $^3Rf^*$ al oxígeno en su estado fundamental (3O_2) da lugar a la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ (reacción (6) del Esquema 1.2).



Esquema 1.2: Reacciones de formación de $O_2(^1\Delta_g)$ y $O_2^{\cdot-}$ bajo condiciones aeróbicas.

A partir del aumento en el rendimiento de estado triplete de la Rf en presencia de las nanopartículas, se espera una mejora en el rendimiento de producción de $O_2(^1\Delta_g)$. Esto se ve en la Figura 1.7, donde se graficó la relación de las áreas obtenidas en los

experimentos de fosforescencia de oxígeno singlete resuelta en el tiempo en presencia y ausencia de distintas cantidades de PecAgNP vs [Ag]. Un aumento del 30% fue obtenido con la máxima concentración de PecAgNP.

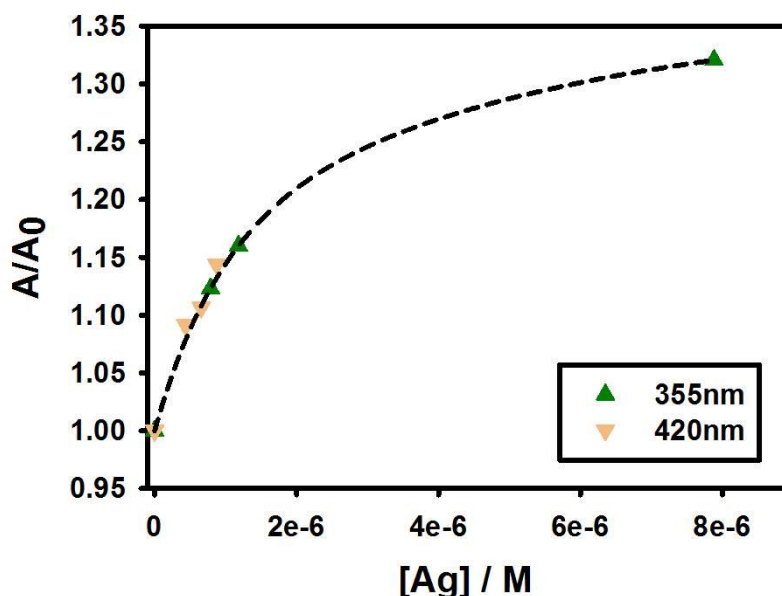


Figura 1.7: Gráfico de la relación entre (A/A_0) de las señales obtenidas para la fosforescencia de oxígeno singlete vs [Ag].

Por otro lado, la Rf produce $O_2^{\cdot -}$ que da lugar a la formación de H_2O_2 (esquema 1.2) con un rendimiento cuántico $\Phi_{O_2^{\cdot -}} = 0.009$ (45). Como en presencia de PecAgNP obtenemos una mayor cantidad de población del estado $^3Rf^*$ y mayores concentraciones de los radicales $Rf^{\cdot -}$ y RfH por la transferencia de carga de Ag al triplete del sensibilizador, también se espera un mayor rendimiento de producción de $O_2^{\cdot -}$ (reacción (7) del Esquema 1.2), el cual lleva a la generación de H_2O_2 . Adicionalmente, otros procesos reportados en la literatura podrían aportar una contribución adicional a la mejora observada del peróxido de hidrógeno en presencia de PecAgNP. De hecho, la desintegración de $RfH^{\cdot -}$ produce cantidades equimolares de Rf y Rf completamente reducida (RfH_2) (proceso (8) en el Esquema 1.2), que en condiciones aeróbicas se oxida al radical $RfH_2^{\cdot +}$ y $O_2^{\cdot -}$, formando finalmente H_2O_2 (reacciones (9) y (10) del Esquema 1.2)

(46). El aumento de la producción de H_2O_2 en presencia de las nanopartículas puede observarse en la Figura 1.17.

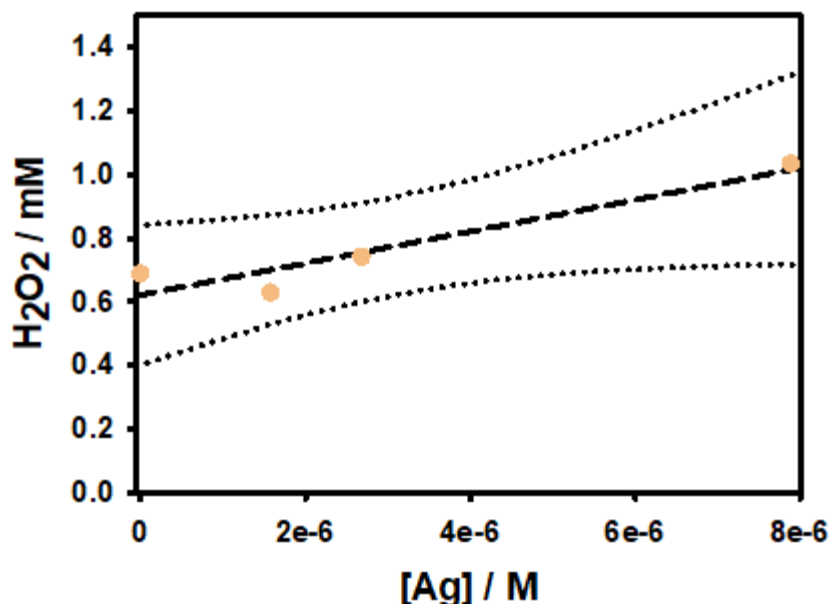


Figura 1.8: Gráfico de $[\text{H}_2\text{O}_2]$ vs $[\text{Ag}]$.

El 60% de aumento obtenido en la concentración de producción de peróxido de hidrógeno para las muestras con la mayor concentración de nanopartículas se debe considerar como un límite inferior porque se sabe que las nanopartículas de plata catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno (47).

Por último, se realizaron ensayos de consumo de oxígeno con un electrodo sensible al oxígeno molecular, con muestras conteniendo FA (un conocido quencher del oxígeno singlete). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1.9. Las concentraciones utilizadas en estos ensayos fueron seleccionadas de acuerdo con la citotoxicidad obtenidas de ensayos en células HeLa que se mostrarán en el próximo capítulo. Por esa razón no se realizaron experimentos con concentraciones tan altas como las empleadas en las Figuras 1.15-1.17, aunque se esperaría un mayor efecto a mayores concentraciones de nanopartículas.

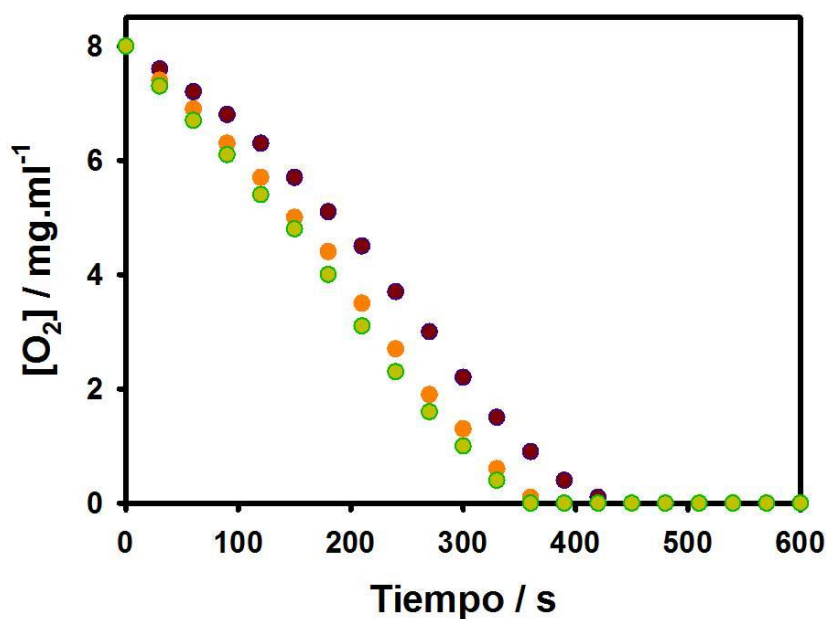


Figura 1.9: Experimentos de consumo de oxígeno con muestras conteniendo 54 μM Rf y 10 mM FA: sin PecAgNP (puntos marrones), con 0.5 μM de PecAgNP (puntos naranjas) y con 1 μM de PecAgNP (puntos verdes).

Como puede observarse, el grado de consumo de oxígeno se ve aumentado en presencia de las PecAgNP. Estos resultados concuerdan con los observados para el aumento en la producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ por parte de la Rf en la presencia de PecAgNP, demostrados en los experimentos de fosforescencia resuelta en el tiempo (ver Figura 1.7 y Figura 1.17, respectivamente).

Conclusiones parciales

- Se demostró la formación de un complejo en estado basal entre la Rf y las PecAgNP por espectroscopía UV-Visible.
- En ensayos de fluorescencia estacionaria se observa quenching de fluorescencia de Rf por PecAgNP. Sin embargo, como el tiempo de vida de fluorescencia permanece constante, se descarta un proceso de quenching colisional o una transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). La disminución de la intensidad de fluorescencia se asigna a un mecanismo de quenching estático debido a que el complejo formado no es fluorescente.
- La excitación a 400 o 355 nm puebla el estado singlete excitado de Rf y el estado excitado del complejo. A partir de estos estados excitados tiene lugar el cruce entre sistemas a los estados triplete libres o unidos a Ag de la Rf (ver Esquema 1.1). Como resultado, en presencia de las partículas, la población del estado triplete de Rf comienza a tiempos más cortos y alcanzando concentraciones más altas.
- Un aumento del 30% en la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ fue obtenido en presencia de la máxima concentración de PecAgNP empleada en los ensayos ($[Ag] = 8 \mu M$).
- Se visualizó un aumento del 60% en la concentración de peróxido de hidrógeno obtenido en la muestra con mayor cantidad de PecAgNP ($[Ag] = 8 \mu M$). El mismo se considera como un límite inferior, debido a que las nanopartículas de plata catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno.

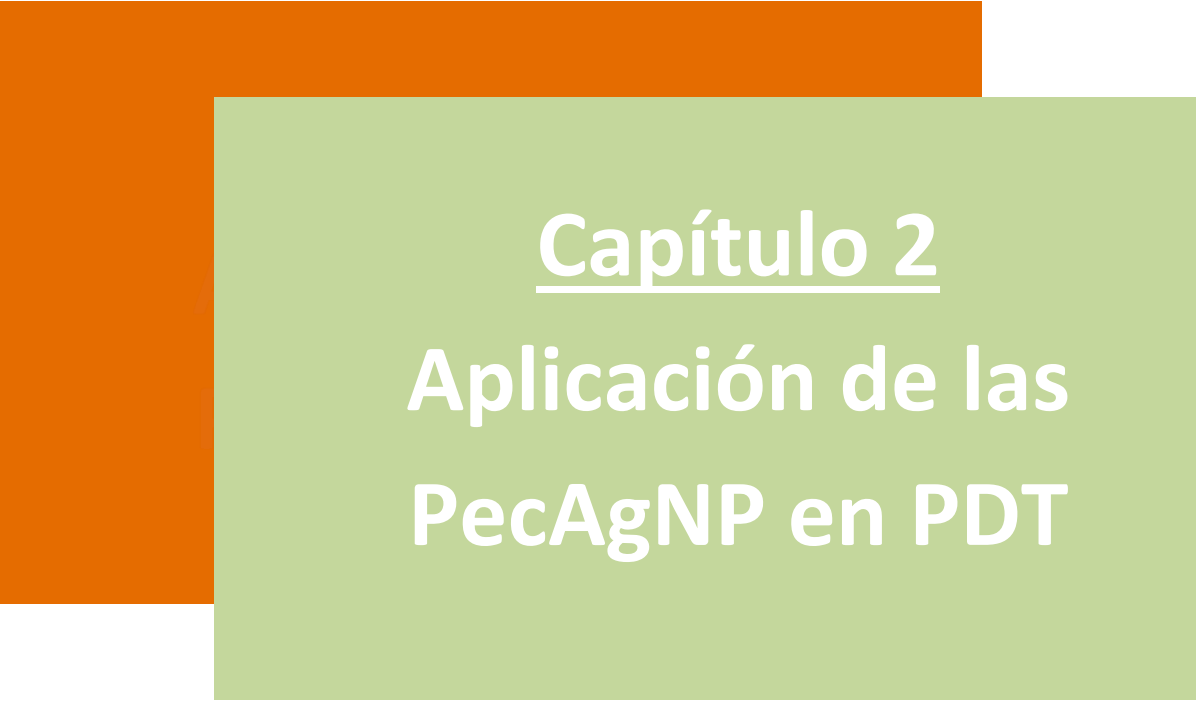
Bibliografía

1. Woodburn K. Chemical Aspects of Photodynamic Therapy By Raymond Bonnett (University of London). Gordon and Breach Science Publishers: London and Newark. J Am Chem Soc. 2001; 123(15):3622.
2. Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Noble metals on the nanoscale: Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. Acc Chem Res. 2008; 41(12):1578–1586
3. Klar T, Perner M, Grosse S, von Plessen G, Spirkel W, Feldmann J. Surface-plasmon resonances in single metallic nanoparticles. Phys Rev Lett. 1998; 80(19):4249–4252.
4. Fang Y, Seong NH, Dlott DD. Measurement of the distribution of site enhancements in surface-enhanced raman scattering. Science. 2008; 321:388–392.
5. Lim DK, Jeon KS, Kim HM, Nam JM, Suh YD. Nanogap-engineerable raman-active nanodumbbells for single-molecule detection. Nature Materials. 2010; 9:60–67.
6. Kinkhabwala A, Yu Z, Fan S, Avlasevich Y, Müllen K, Moerner WE. Large single-molecule fluorescence enhancements produced by a bowtie nanoantenna. Nat Photonics. 2009; 3:654–657.
7. Stellacci F, Bauer CA, Meyer-Friedrichsen T, Wenseleers W, Marder SR, Perry JW. Ultrabright supramolecular beacons based on the self-assembly of two-photon chromophores on metal nanoparticles. J Am Chem Soc. 2003; 125(2):328–329.
8. Noginov MA, Zhu G, Belgrave AM, Bakker R, Shalae VM, Narimanov EE, Stout S, Herz E, Suteewong T, Wiesner U.. Demonstration of a spaser-based nanolaser. Nature. 2009. 460(7259):1110–1112.
9. Sundaramurthy A, Schuck PJ, Conley NR, Fromm DP, Kino GS, Moerner WE. Toward nanometer-scale optical photolithography: Utilizing the near-field of bowtie optical nanoantennas. Nano Lett. 2006; 6(3): 355–360.
10. Ueno K, Juodkazis S, Shibuya T, Yokota Y, Mizeikis V, Sasaki K, et al. Nanoparticle plasmon-assisted two-photon polymerization induced by incoherent excitation source. J Am Chem Soc. 2008; 130: 6928–6929 .
11. Standridge SD, Schatz GC, Hupp JT. Distance dependence of plasmon-enhanced photocurrent in dye-sensitized solar cells. J Am Chem Soc. 2009; 131(24):8407–8409.
12. Hirakawa T, Kamat P V. Charge separation and catalytic activity of Ag@TiO₂ core-shell composite clusters under UV-irradiation. J Am Chem Soc. 2005; 127(11):3928–3934.
13. Tian Y, Tatsuma T. Mechanisms and applications of plasmon-induced charge

- separation at TiO₂ films loaded with gold nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2005; 27(20): 7632–7637.
14. Awazu K, Fujimaki M, Rockstuhl C, Tominaga J, Murakami H, Ohki Y, Yoshida N, Watanabe T. A plasmonic photocatalyst consisting of silver nanoparticles embedded in titanium dioxide. *J Am Chem Soc.* 2008; 130(5):1676-1680.
 15. Liu GL, Yin Y, Kunchakarra S, Mukherjee B, Gerion D, Jett SD, Bear DG, Gray JW, Alivisatos AP, Lee LP, Chen FF. A nanoplasmonic molecular ruler for measuring nuclease activity and dna footprinting. *Nat Nanotechnol.* 2006; 1:47-52.
 16. Anker JN, Hall WP, Lyandres O, Shah NC, Zhao J, Van Duyne RP. Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nature Materials.* 2008; 7:442–453.
 17. Sepúlveda B, Angelomé PC, Lechuga LM, Liz-Marzán LM. LSPR-based nanobiosensors. *Nano Today.* 2009; 4:244-251.
 18. Kabashin A V., Evans P, Pastkovsky S, Hendren W, Wurtz GA, Atkinson R, Pollard R, Podolskiy VA, Zayats AV. Plasmonic nanorod metamaterials for biosensing. *Nat Mater.* 2009; 8:867–871.
 19. De Melo LSA, Gomes ASL, Saska S, Nigoghossian K, Messaddeq Y, Ribeiro SJL, de Araujo RE. Singlet oxygen generation enhanced by silver-pectin nanoparticles. *J Fluoresc.* 2012; 22(6):1633–1638.
 20. Balachandran YL, Girija S, Selvakumar R, Tongpim S, Gutleb AC, Suriyanarayanan S. Differently Environment Stable Bio-Silver Nanoparticles: Study on Their Optical Enhancing and Antibacterial Properties. *PLoS One.* 2013; 8(10):1–14.
 21. Merga G, Wilson R, Lynn G, Milosavljevic BH, Meisel D. Redox catalysis on “naked” silver nanoparticles. *J Phys Chem C.* 2007; 111(33):12220–12226.
 22. Gnanasambandam R. Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chem.* 2000; 68(3):327–332.
 23. Kirshenbaum AD, Cahill JA, Grosse A V. The density of liquid silver from its melting point to its normal boiling point 2450°K. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry.* 1962; 24:333-336.
 24. Benesi HA, Hildebrand JH. a Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine With Aromatic Hydrocarbons. *J Am Chem Soc.* 1949; 71(8):2703–2707.
 25. Drossler P, Holzer W, Penzkofer a, Hegemann P. Fluorescence quenching of riboflavin in aqueous solution by methionine and cysteine. *Chem Phys.* 2003; 286(2–3):409–420.
 26. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* 2006.
 27. Link S, El-Sayed MA. Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. *Annu Rev Phys Chem.* 2003; 54(1):331–366.

28. Link S, El-Sayed MA. Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods. *J Phys Chem B*. 1999; 103(40):8410–8426.
29. Ahmadi TS, Logunov SL, El-Sayed M a. Picosecond Dynamics of Colloidal Gold Nanoparticles. *J Phys Chem*. 1996; 100(20):8053–8056.
30. Link S, Burda C, Wang ZL, El-Sayed M a. Electron dynamics in gold and gold-silver alloy nanoparticles: The influence of a nonequilibrium electron distribution and the size dependence of the electron-phonon relaxation. *J Chem Phys*. 1999; 111(3):1255–6124.
31. Porcal G, Bertolotti SG, Previtali CM, Encinas M V. Electron transfer quenching of singlet and triplet excited states of flavins and lumichrome by aromatic and aliphatic electron donors. *Phys Chem Chem Phys*. 2003; 5(19):4123.
32. Weigel A, Dobryakov AL, Veiga M, Pérez Lustres JL. Photoinduced processes in riboflavin: Superposition of $\pi\pi^*$ - $n\pi^*$ states by vibronic coupling, transfer of vibrational coherence, and population dynamics under solvent control. *J Phys Chem A*. 2008;112(47):12054–12065.
33. Lebedev M V., Misochko O V., Dekorsy T, Georgiev N. On the nature of “coherent artifact.” *J Exp Theor Phys*. 2005; 100(2):272–282.
34. Monni R, Al Haddad A, van Mourik F, Auböck G, Chergui M. Tryptophan-to-heme electron transfer in ferrous myoglobins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(18):5602-5606.
35. Orellana B, Rufs a M, Encinas M V, Previtali CM, Bertolotti S. The Photoinitiation Mechanism of Vinyl Polymerization by Riboflavin/Triethanolamine in Aqueous Medium. *Macromolecules*. 1999; 32(20):6570–6573.
36. Li H, Melø TB, Razi Naqvi K. Triplets, radical cations and neutral semiquinone radicals of lumiflavin and riboflavin: An overhaul of previous pump-probe data and new multichannel absolute absorption spectra. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2012; 106(1):34–39.
37. Tan SLJ, Webster RD. Electrochemically induced chemically reversible proton-coupled electron transfer reactions of riboflavin (Vitamin B2). *J Am Chem Soc*. 2012; 134(13):5954–5964.
38. Lu C, Bucher G, Sander W. Photoinduced interactions between oxidized and reduced lipoic acid and riboflavin (vitamin B2). *ChemPhysChem*. 2004; 5(1):47-56.
39. Kimore K, Guha SN. Pulse radiolysis study of one electron oxidation of riboflavin. 1991;38(1):119–125.
40. Arce VB, Bertolotti SG, Oliveira FJVE, Airoidi C, Gonzalez MC, Allegretti PE, Martire DO. Safranin-T triplet-state quenching by modified silica nanoparticles. *J Phys Chem C*. 2011; 115(37):18122–18130.

41. Ivanova OS, Zamborini FP. Size-dependent electrochemical oxidation of silver nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2010; 132:70-72.
42. van Wilderen LJGW, Lincoln CN, van Thor JJ. Modelling multi-pulse population dynamics from ultrafast spectroscopy. *PLoS One.* 2011; 6(3):17373.
43. Lu C, Han Z, Liu G, Cai X, Chen Y, Yao S. Photophysical and photochemical processes of riboflavin (vitamin B2) by means of the transient absorption spectra in aqueous solution. *Sci China Ser B Chem.* 2001; 44(1):39–48.
44. Shield SR, Harris JM. Reaction Kinetics at Dispersed-Colloid / Solution Interfaces : Benzophenone Triplet-State Quenching by Methylated Silica Particles. 2000; 8527–8535.
45. Krishna CM, Uppuluri S, Riesz P, JR JSZ, Balasubramanian D. A study of the photodynamic efficiencies of some eye lens constituents. *Photochem Photobiol.* 1991;54(1):51–58.
46. Criado S, García NA. A comparative kinetic and mechanistic study between tetrahydrozoline and naphazoline toward photogenerated reactive oxygen species. *Photochem Photobiol.* 2010; 86(1):23–30.
47. He D, Jones AM, Garg S, Pharm AN, Waite TD. Silver nanoparticle– reactive oxygen species interactions: application of a charging– discharging model. *J Phys Chem C.* 2011; 115:5461–5468.



Capítulo 2

Aplicación de las PecAgNP en PDT

***“Los científicos dicen que estamos hechos de átomos, pero a mí un pajarito me contó
que estamos hechos de historias”***

Eduardo Galeano

Como se habló en la introducción, la PDT consiste en la fotoirradiación del tumor luego de la aplicación de un fotosensibilizador (1).

Hay muchos trabajos en la literatura que muestran el papel beneficioso de las nanopartículas metálicas en la actividad fotodinámica de fotosensibilizadores orgánicos. En particular, se prepararon varios nanohíbridos de sensibilizadores orgánicos con nanopartículas de metales nobles y sus beneficios en PDT se demostraron en diversas líneas celulares de carcinoma. Citaremos a continuación algunos ejemplos en los cuáles los nanohíbridos fueron más efectivos que los fotosensibilizadores solos:

- Complejos de Ptoporfirina IX y nanopartículas de oro en células HeLa (2,3).
- Nanopartículas de oro funcionalizadas con ftalocianina de zinc y lactosa, aplicadas en células de cáncer de mama SK-BR-3 (4).
- Nanopartículas de oro conjugadas con una clorina, aplicadas en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (5).
- Nanopartículas de oro con recubrimiento del surfactante plurónico que incorporan el colorante hidrofóbico IR780, en células de carcinoma de colon murino C-26 (6).
- Nanocompuestos de oro conjugados con hematoporfirina, en células leucémicas MT-4 (7).
- Híbridos de nanopartículas de oro con Feoforbida A (PheoA), y ácido hialurónico en la línea celular de cáncer de pulmón A549 (8).
- Híbridos de nanopartículas de oro y una porfirina, que contienen unido un agente diana capaz de reconocer al receptor erbB2 sobreexpresado en la superficie de células SK-BR-3 de cáncer de mama (9).
- Complejos de nanoclusters de oro y Clorina 6, cargados en liposomas sensibles al pH (10).

Nuestro fotosensibilizador, la Rf se encuentra presente en los sistemas biológicos como constituyente de algunas proteínas, actuando como cofactor de las mismas (11). La transferencia de electrones de numerosos donores presentes en las células al estado $^3Rf^*$ inicia el proceso Tipo I de la PDT. Además, la irradiación de la Rf en condiciones aeróbicas, lleva a la formación de $O_2(^1\Delta_g)$ por el mecanismo Tipo II de la PDT (12).

En el capítulo anterior presentamos los resultados que nos permitieron ver que por la formación de un complejo entre la Rf y las PecAgNP, se logra una mayor población del estado triplete, y como consecuencia un aumento en la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ y O_2^- .

Es por esto que decidimos probar el aumento de la eficiencia de la Rf como fotosensibilizador en PDT en presencia de las nanopartículas, utilizando células HeLa como modelo de estudio. Para tal fin se llevaron a cabo diversos ensayos, cuyos resultados se presentan en este capítulo:

- Se analizó la citotoxicidad en luz y oscuridad de la Rf, de las PecAgNP y de mezclas de ambas.
- Se realizaron ensayos de Anexina V y PI para evaluar la forma en que ocurre la muerte celular en presencia de estos agentes.
- Se llevaron a cabo ensayos de microscopía FTIR con energía de radiación sincrotrón para evaluar los posibles cambios estructurales del DNA y de las proteínas nucleares al someter las células HeLa a los distintos tratamientos.

Ingreso de la Riboflavina a las células

Se utilizaron medidas de fluorescencia para evaluar el ingreso de la Rf dentro de las células HeLa ($\lambda^{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda^{\text{em}} = 530 \text{ nm}$). Las células fueron contadas, y la fluorescencia de cada muestra fue medida y corregida por el número de células. Los resultados de la comparación de los espectros de emisión de fluorescencia de soluciones de Rf en medio de cultivo OPTIMEM antes y después de la incorporación en las células se muestran en la Figura 2.1.

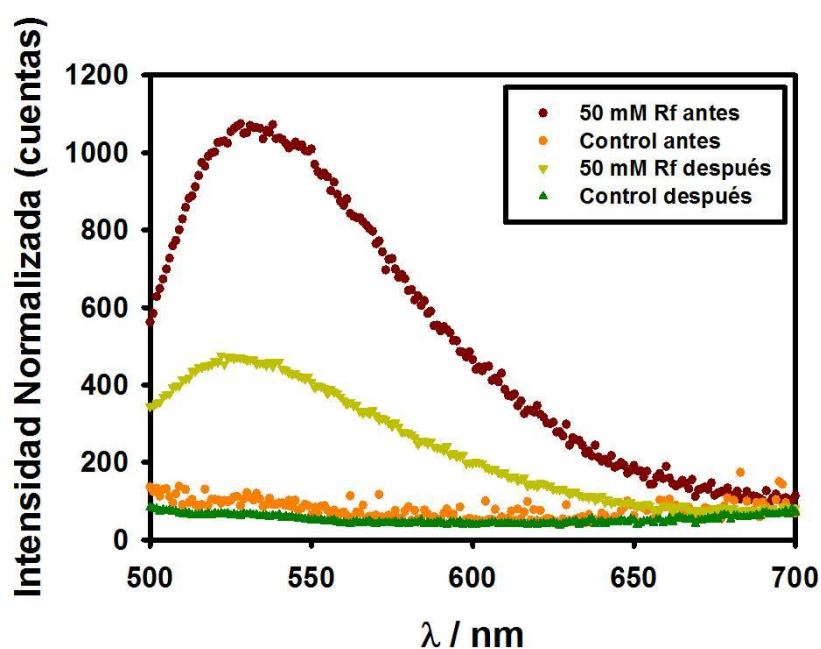


Figura 2.1: Espectro de emisión ($\lambda^{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$) de la Rf en OPTIMEM antes y después de la incorporación en células HeLa. Se muestra, además, el control de emisión del medio sin Rf antes y después de la incubación.

Como puede observarse en la figura, el ingreso de Rf en las células fue significativo-y de alrededor del 50%.

Ensayos de citotoxicidad en células HeLa

Para este tipo de ensayos, se utilizaron las técnicas de MTT y RN. En todos los experimentos llevados a cabo, los valores de absorbancia de formazan y rojo neutro se normalizaron frente a valores promedio obtenidos de células a las que no se habían agregado ni Rf ni PecAgNP (control). Las barras de error se refieren a una desviación estándar; en cada caso, el número de muestras examinadas fue entre 4 y 8. Como

análisis estadístico se utilizó una prueba ANOVA unidireccional con prueba postoperatoria de Fisher ($p < 0.05$).

Los ensayos de MTT y RN fueron llevados a cabo en células HeLa no irradiadas en presencia de Rf (0 a 100 μM) o PecAgNP (0 a 1 μM en [Ag]) para poder encontrar las concentraciones óptimas a utilizar en los ensayos de irradiación. Los resultados se muestran en la Figura 2.2, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre las distintas muestras y el control.

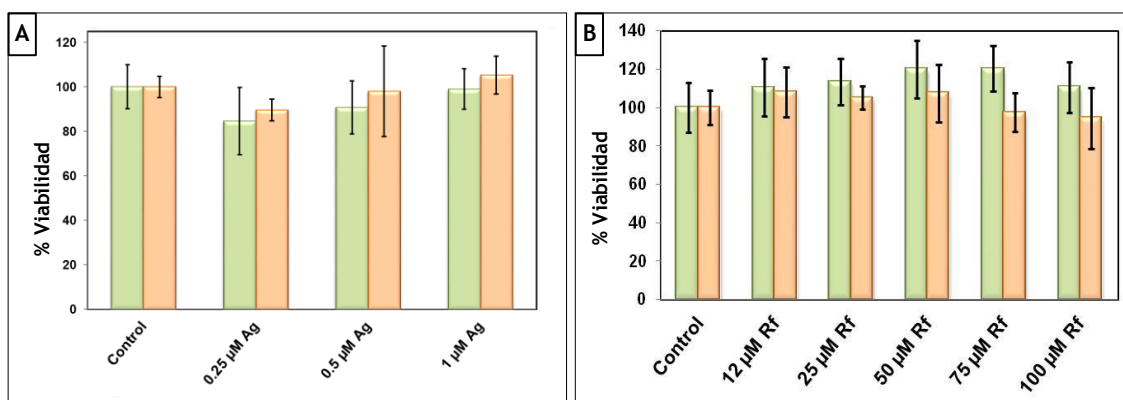


Figura 2.2: Histogramas de los ensayos de MTT (verde) y RN (naranja) en células HeLa no irradiadas tratadas con diferentes concentraciones de PecAgNP (A) o Rf (B) en el medio de incubación.

Los ensayos llevados a cabo irradiando las células HeLa fueron realizados utilizando dos lámparas RPR-3500 A con una emisión centrada en 350 nm. El espectro de las mismas se muestra en la Figura 2.3.

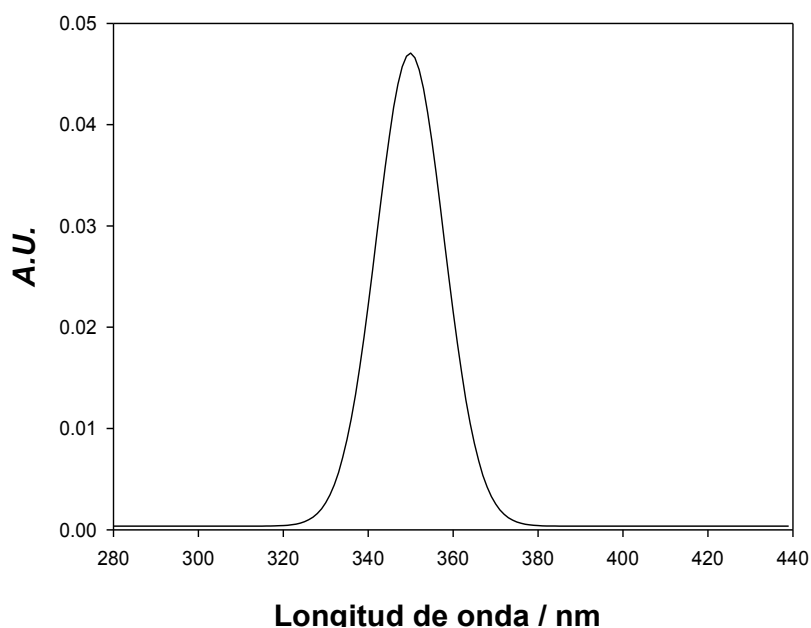


Figura 2.3: Espectro de emisión de las lámparas RPR-3500.

Del espectro de la Figura 2.3, obtuvimos que la energía media de fotones emitida $\langle E \rangle$ es igual a $341,9 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

Mediante la actinometría del sistema de irradiación utilizado, obtuvimos un valor de $P_0 = 1,06 \cdot 10^{-4} \text{ einstein.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Como el volumen irradiado en cada well fue de 0.1 mL , el número de fotones incidentes por unidad de tiempo en este volumen fue de $1.06 \cdot 10^{-8} \text{ einstein.s}^{-1}$. Con este valor y el $\langle E \rangle$, se obtuvo una energía incidente por unidad de tiempo de $3,62 \text{ mJ.s}^{-1}$. Finalmente, teniendo en cuenta el área de cada well irradiada, obtuvimos un valor de irradiancia de $9,6 \text{ mJ.cm}^{-2}.\text{s}^{-1} = 9,6 \text{ mW.cm}^{-2}$.

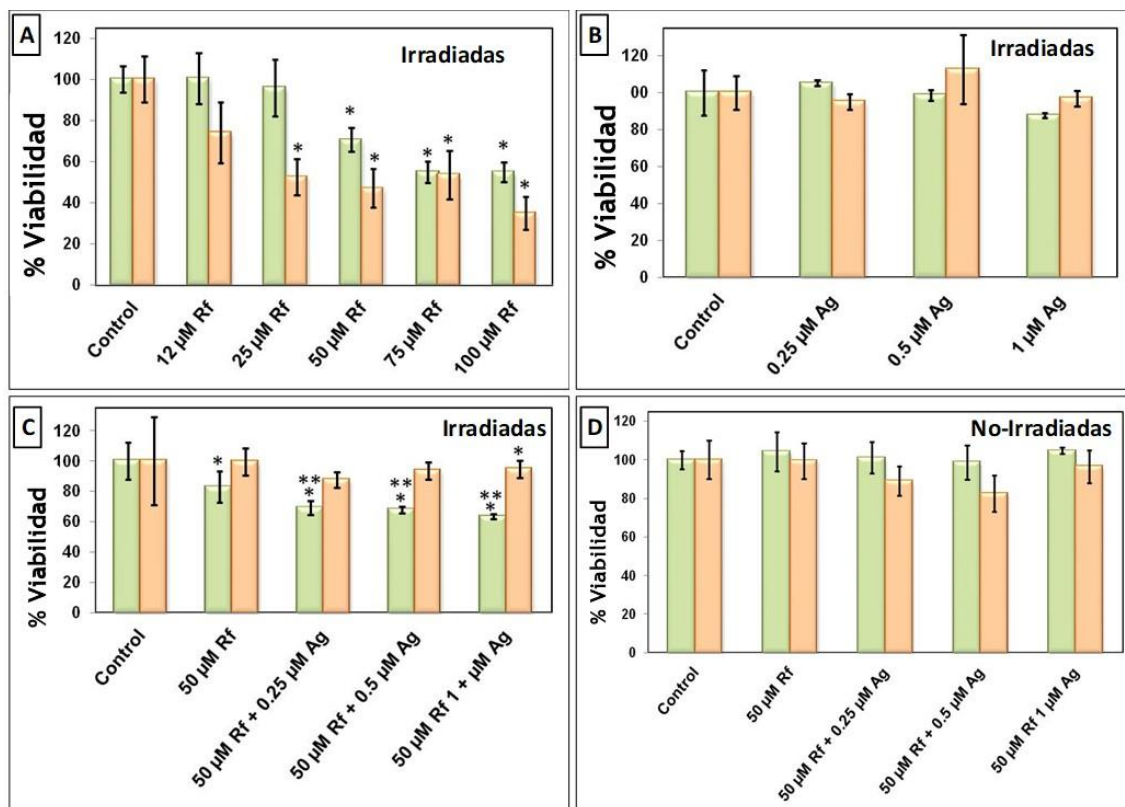


Figura 2.4: Histogramas de los ensayos de MTT (verde) y RN (naranja) en células HeLa irradiadas durante 2 hs ($\lambda^{exc} = 350\text{nm}$) (A, B, C) y no irradiadas (D). Los datos mostrados se obtuvieron de experimentos en los que Rf (A), PecAgNP (B) y Rf + PecAgNP (C, D) estaban presentes en el medio de incubación. El asterisco indica que hay una diferencia significativa entre este número particular y el número obtenido para el control. El doble asterisco significa una diferencia estadísticamente significativa de la muestra irradiada con Rf.

Debemos aclarar que luego de incubar las células con los distintos tratamientos, al momento de la irradiación el medio de cultivo fue reemplazado por medio DMEM/F12 sin rojo fenol, para evitar que el mismo interfiera en los ensayos.

Los resultados muestran que un incremento de Rf en el medio de cultivo de 0 a 25 μM bajo irradiación, no tiene un efecto significativo en la viabilidad celular de reducir el compuesto MTT a formazan. A mayores concentraciones de Rf (de 25 a 100 μM) se observa una disminución en la viabilidad celular, en comparación con el control (ver Figura 2.4 (a)).

Los ensayos de RN, que testean la capacidad de las células viables de ingresar el colorante e incorporarlo a los lisosomas, muestran una disminución en la viabilidad celular desde concentraciones de Rf iguales o mayores a 25 μM (ver Figura 2.4 (a)).

En la Figura 2.4 (b), podemos ver que, tanto para los ensayos de MTT como para los de RN, la presencia de PecAgNP no produce ningún cambio en la viabilidad de las células al ser irradiadas.

Para evaluar un posible aumento del daño producido por la presencia de PecAgNP en el medio con Rf, los ensayos de MTT y RN fueron realizados con células incubadas con 50 μ M de Rf y diferentes cantidades de PecAgNP (0.25, 0.5 y 1 μ M). Como se observa en la Figura 2.4 (c), la adición de nanopartículas produce una disminución de la viabilidad celular en los ensayos de MTT (no así en los de RN).

Se realizaron ensayos en oscuridad para las muestras incubadas con mezclas de las concentraciones elegidas de Rf y PecAgNP y tampoco se encontraron diferencias significativas con respecto al control (ver Figura 2.4 (d)).

Ensayos de Anexina V y PI

Cuando células in vitro son tratadas con PDT, el mecanismo de muerte celular aceptado es el de apoptosis (13).

Los ensayos de Anexina V y PI fueron realizados para evaluar si las células HeLa, luego de ser incubadas con Rf y PecAgNP y ser sometidas a un tratamiento de PDT se encontraban viables, apoptóticas o necróticas.

El ensayo de Anexina V se utiliza para la detección de células apoptóticas debido a su afinidad de unión por la fosfatidilserina cargada negativamente. La fosfatidilserina es una proteína que es expuesta en la membrana celular al comienzo del proceso apoptótico. Durante los eventos anteriores de la apoptosis, este fosfolípido sufre una translocación desde el lado interno de la membrana plasmática hacia el exterior (14). La Anexina V, se encuentra conjugada con una gran variedad de fluorocromos: Alexa Fluor (350, 488, 568, 594 y 647), Fluoresceína (FITC), Verde de Oregon 488, R-Ficoeritrina, Alofocianina y Pacific Blue (INVITROGEN, 2009), convirtiéndose así en una proteína recombinante que actúa como un biomarcador efectivo en células apoptóticas. (15–19). En nuestro caso se empleó Anexina V conjugada con FITC.

El PI es una molécula catiónica fluorescente capaz de teñir el ADN celular, ya que se une al mismo intercalándose entre las bases, con poca o ninguna preferencia de secuencia. El mismo no es permeable a la membrana celular a menos que esta se vea comprometida, por lo que solo entrará en las células cuando sus membranas están rotas, una característica de la necrosis y apoptosis tardía (20).

Se ha evidenciado que la combinación de Anexina V con un marcador de ADN como el PI, puede garantizar la diferenciación que se presenta en el siguiente cuadro (17,21–23):

Anexina V	-	+	+
PI	-	-	+
Estadío Celular	No Apoptóticas	Apoptosis Temprana	Necróticas

Las células control y con los distintos tratamientos (incubadas con Rf y/o PecAgNP por 24 hs), fueron irradiadas a 405 nm (142 μ W) durante 5 minutos, de modo de aplicar la PDT.

Para la prueba de PI la longitud de onda de excitación fue de 561 nm (40 μ W) y la máxima longitud de onda de emisión fue de 620 nm. Para la de Anexina V-FITC, la excitación fue a 488 nm (21 μ W), y la máxima longitud de onda de emisión fue de 530 nm.

Las células HeLa irradiadas, pre-incubadas con 50 μ M Rf, arrojaron un resultado positivo al ensayo de Anexina V, pero negativo a PI como puede verse en la Figura 2.5. Esto nos indica un mecanismo de muerte celular de apoptosis temprana. Esto está de acuerdo con el hecho de que la apoptosis es el mecanismo principal de muerte celular cuando las células se tratan con PDT in vitro (13).

Por el contrario, cuando también fueron incluidas las PecAgNP en el medio de cultivo, no solo el ensayo de Anexina V, sino que también el PI arrojaron resultados positivos, lo que nos indica un mecanismo de muerte celular por apoptosis tardía o necrosis.

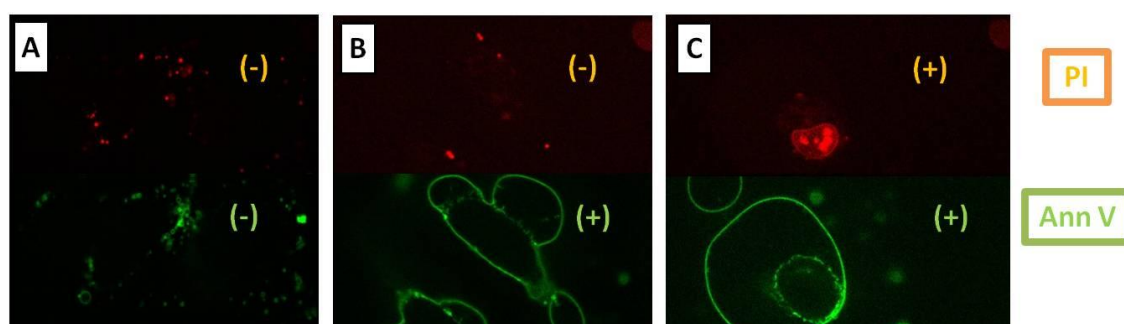


Figura 2.5: Imágenes de fluorescencia tomadas después de 5 minutos de irradiación a 405 nm (142 μ W). (a) Control (b) 50 μ M RF (c) 50 μ M de Rf y 1 μ M de PecAgNP.

Microscopía SR-FTIR

En un trabajo de nuestro grupo, se demostró (en células HeLa) utilizando dos fotosensibilizadores distintos, uno hidrofílico y otro hidrofóbico, que el β -caroteno intracelular no quenchea al oxígeno singlete, pero si tiene un efecto fotoprotector. La fotoprotección de β -caroteno implica el secuestro de otros radicales que también son producidos como consecuencia de la irradiación de los sensibilizadores con luz visible y las reacciones posteriores a la formación de oxígeno singlete (24).

Con estos antecedentes, en otro trabajo del grupo se procedió a estudiar si el efecto del β -caroteno de atrapar ciertos radicales libres tiene alguna consecuencia en los cambios de las proteínas nucleares asociadas con las primeras etapas del proceso de apoptosis. Para este fin se empleó la microespectroscopía FTIR de radiación sincrotrón, que como se comentó en la sección de materiales y métodos, es una técnica de microespectroscopía vibratoria que se usa como una herramienta de diagnóstico útil para probar cambios moleculares dentro de las células o tejidos sometidos a diferentes tratamientos (25).

Para estos experimentos, se volvieron a utilizar los mismos fotosensibilizadores que en el trabajo previo (24): la porfirina catiónica hidrofílica, TMPyP, que tiende a acumularse en el núcleo celular; y un fotosensibilizador de naturaleza hidrofóbica, el TPPCOOMe, el cuál es incapaz de ingresar al núcleo celular. También se utilizaron el β -caroteno y el imidazol, como potenciales fotoprotectores hidrofóbico e hidrofílico, respectivamente. Distintas líneas celulares fueron sometidas a procesos de PDT en presencia de las moléculas anteriormente nombradas. También se realizaron los controles en oscuridad (25).

Los datos fueron analizados en la región de la banda de la Amida I (1600 a 1700 cm^{-1}). Las bandas pertenecientes a la Amida I y la Amida II (1500 a 1560 cm^{-1}) surgen principalmente de las vibraciones C=O y C-N de las estructuras de los péptidos, respectivamente. La espectroscopía FTIR es sensible a los cambios estructurales de la conformación secundaria de las proteínas, que dan lugar a cambios vibracionales de la banda de la Amida I (C=O), la cual se ve afectada por los diferentes entornos de los enlaces puente de hidrógeno en las α -hélices, hojas β , y otras estructuras desordenadas (26–28).

Los efectos más relevantes se observaron con las células HeLa sometidas a PDT empleando TMPyP como fotosensibilizador. El tratamiento dio como resultado un aumento de la absorción en la región de los números de onda más cortos de las regiones de Amida I y Amida II, que se asignaron a un corrimiento β y a agregados intramoleculares β (29). Adicionalmente, el área de la señal perteneciente a los ácidos nucleicos aumentó comparativamente más que la de la Amida II. Tanto el β -caroteno

como el imidazol, mostraron efectos fotoprotectores en células HeLa expuestas a PDT con TMPyP o TPCOOMe (25).

Con estos antecedentes, se decidió utilizar la técnica de espectroscopía FTIR para evaluar si nuestros tratamientos de PDT con Rf y PecAgNP, mostraban algún cambio en los espectros FTIR de los núcleos celulares.

Se sembraron células HeLa en portaobjetos de CaF₂ y se sometieron a los siguientes tratamientos:

- Células HeLa no irradiadas e irradiadas sin la adición de Rf o PecAgNP en el medio de incubación (controles).
- Células HeLa irradiadas previamente incubadas con Rf 50 μ M.
- Células HeLa irradiadas pre-incubadas con 1 μ M M PecAgNP
- Células HeLa irradiadas pre-incubadas con 50 μ M Rf y 1 μ M PecAgNP
- Células HeLa irradiadas pre-incubadas con 10 μ M TMPyP para comparación, ya que, en el trabajo mencionado de nuestro grupo, este fotosensibilizador mostró cambios en los espectros FTIR de las bandas de Amida I y Amida II.

Los espectros de FTIR obtenidos, fueron procesados previamente para eliminar aquellas muestras que mostraban una dispersión debido a artefactos, los cuales podían enmascarar los eventos biológicos de interés. Luego de esto, se obtuvieron los espectros de orden cero (espectros sin derivar) y de segundo orden (espectros obtenidos a partir de la segunda derivada).

En la Figura 2.6 se muestran los valores del análisis PCA, el gráfico de sedimentación correspondiente y los espectros de orden cero en la región de las bandas Amida I y Amida II (1480-1720 cm^{-1}). La Figura 2.6 (c), indica que son suficientes 3 componentes principales para explicar el 95,3% de la varianza. Las Figuras 2.6 (a) y (b) muestran respectivamente las puntuaciones PC2 vs. PC1 y PC3 vs. PC1, con los correspondientes intervalos de confianza bidimensionales del 90%. La Figura 2.6 (d) muestra la media de los espectros de cada tratamiento.

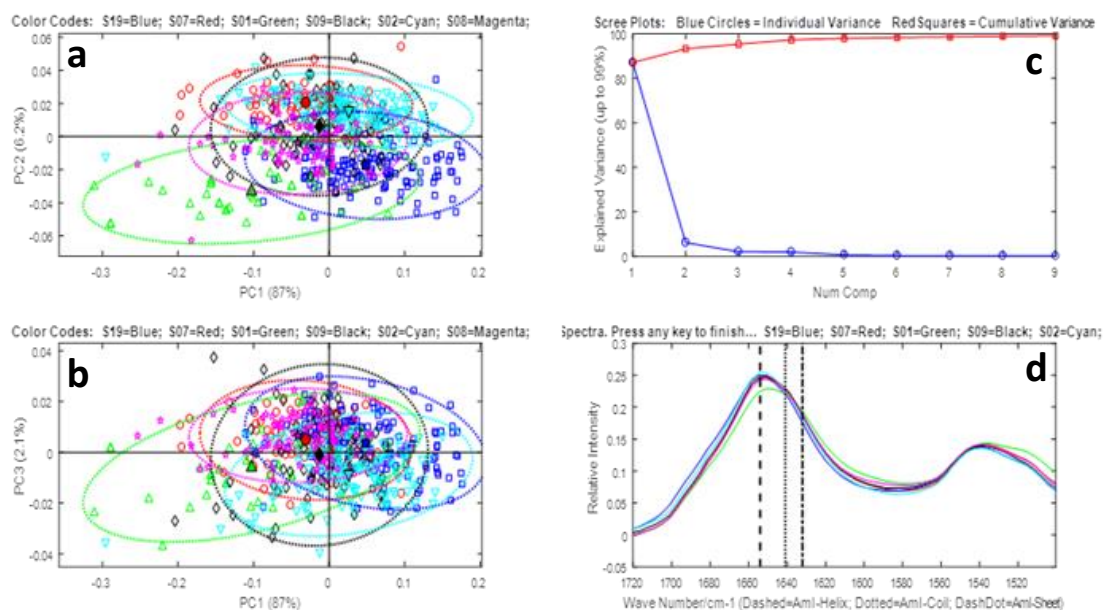


Figura 2.6: Valores obtenidos del análisis de PCA en la región de las Bandas de Amida I y Amida II ($1480-1720\text{ cm}^{-1}$): (a) PC2 vs. PC1, (b) PC3 vs. PC1, (d) y media de espectros de orden cero de las siguientes muestras: células HeLa no irradiadas (azul) e irradiadas (rojas) sin la adición de Rf o PecAgNP en el medio de incubación (controles); células HeLa irradiadas pre-incubadas con Rf $50\text{ }\mu\text{M}$ (magenta), células HeLa irradiadas pre-incubadas con $1\text{ }\mu\text{M}$ M PecAgNP (negro), células HeLa irradiadas pre-incubadas con Rf $50\text{ }\mu\text{M}$ y PecAgNP $1\text{ }\mu\text{M}$ (turquesa), y células HeLa irradiadas pre-incubadas con TMPyP $10\text{ }\mu\text{M}$ para comparación (verde). Las líneas verticales muestran los números de onda esperados para los picos de α -hélice (1654 cm^{-1}), hoja- β (1632 cm^{-1}) y estructuras desordenadas (1641 cm^{-1}) (30–32). (c) gráfico de sedimentación: varianza individual (azul) y varianza acumulada (rojo).

El análisis muestra que el componente principal PC1 (que explica el 87% de la variación) distingue entre las células HeLa tratadas con PDT utilizando TMPyP como fotosensibilizador de todas las demás muestras. El TMPyP tiende a acumularse en el núcleo celular, e induce cambios en la estructura en la banda de Amida I (disminución de la porción de α -hélice) (25).

Estos resultados indican que no fue posible detectar mediante microscopía SR-FTIR ningún cambio significativo en la estructura secundaria de proteínas nucleares de células HeLa irradiadas, previamente incubadas con Rf y/o PecAgNP.

Resultados similares fueron obtenidos del PCA para la derivada segunda de los espectros (ver Figura 2.7).

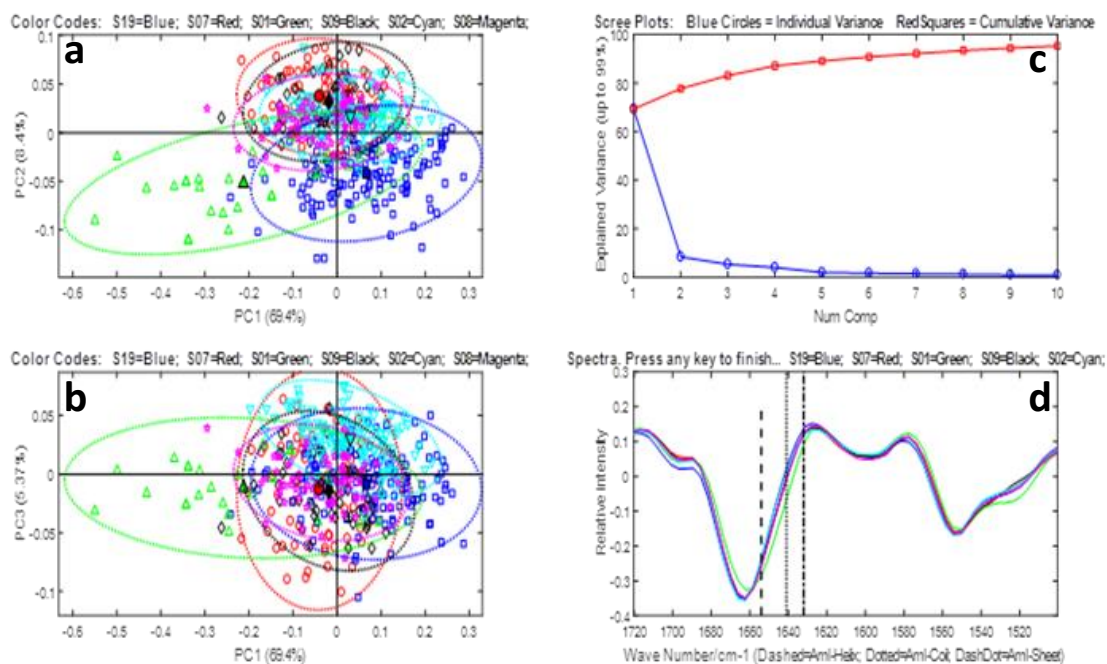


Figura 2.7: Resultados de PCA en la región de la Amida I y bandas de Amida II (1480-1720 cm⁻¹): (a) PC2 vs. PC1, (b) PC3 vs. PC1, (d) media de los espectros de segundo orden de las siguientes muestras: células HeLa no irradiadas (azul) e irradiadas (rojas) sin la adición de Rf o PecAgNP en el medio de incubación (controles); células HeLa irradiadas pre-incubadas con Rf 50 μM (magenta), células HeLa irradiadas pre-incubadas con 1 μM M PecAgNP (negro), células HeLa irradiadas pre-incubadas con Rf 50 μM y PecAgNP 1 μM (turquesa), y células HeLa irradiadas pre-incubadas con TMPyP 10 μM para comparación (verde). Las líneas verticales muestran los números de onda esperados para los picos de α-hélice (1654 cm⁻¹), hoja-β (1632 cm⁻¹) y estructuras desordenadas (1641 cm⁻¹) (30–32); (c) gráfico de sedimentación: varianza individual (azul) y varianza acumulada (rojo).

Con el fin de inspeccionar cualquier cambio en la región del pico de Amida III y también incluir la absorción de ácidos nucleicos, el análisis de PCA también se realizó en una región de número de onda extendida: 1748-952 cm⁻¹ (31). En esta región, para los espectros de orden cero y de segundo orden, también se observó que solo la muestra incubada con TMPyP mostró un comportamiento diferente, confirmando que bajo las condiciones de nuestros experimentos solo el uso de la porfina como fotosensibilizador afectó la absorción IR de las amidas así como de los ácidos nucleicos (ver Figura 2.8 y Figura 2.9).

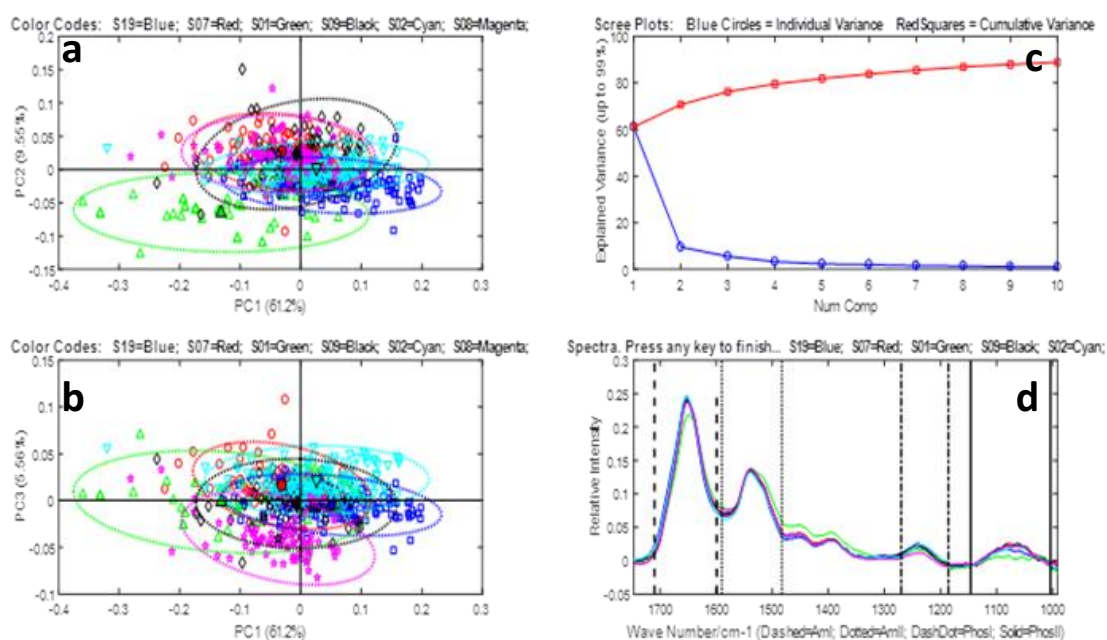


Figura 2.8: Resultados de PCA en la región de Amida I, Amida II, Amida III y Ácidos Nucleicos (952-1748 cm⁻¹): (a) PC2 vs. PC1, (b) PC3 vs. PC1, (d) media de los espectros derivados de orden cero de las siguientes muestras: células HeLa no irradiadas (azul) e irradiadas (rojas) sin la adición de Rf o PecAgNP en el medio de incubación (controles); células HeLa irradiadas pre-incubadas con Rf 50 μM (magenta), células HeLa irradiadas pre-incubadas con 1 μM M PecAgNP (negro), células HeLa irradiadas pre-incubadas con Rf 50 μM y PecAgNP 1 μM (turquesa), y células HeLa irradiadas pre-incubadas con TMPyP 10 μM para comparación (verde). Las líneas verticales muestran los números de onda esperados para los picos de α-hélice (1654 cm⁻¹), hoja-β (1632 cm⁻¹) y estructuras desordenadas (1641 cm⁻¹) (30–32); (c) gráfico de sedimentación: varianza individual (azul) y varianza acumulada (rojo).

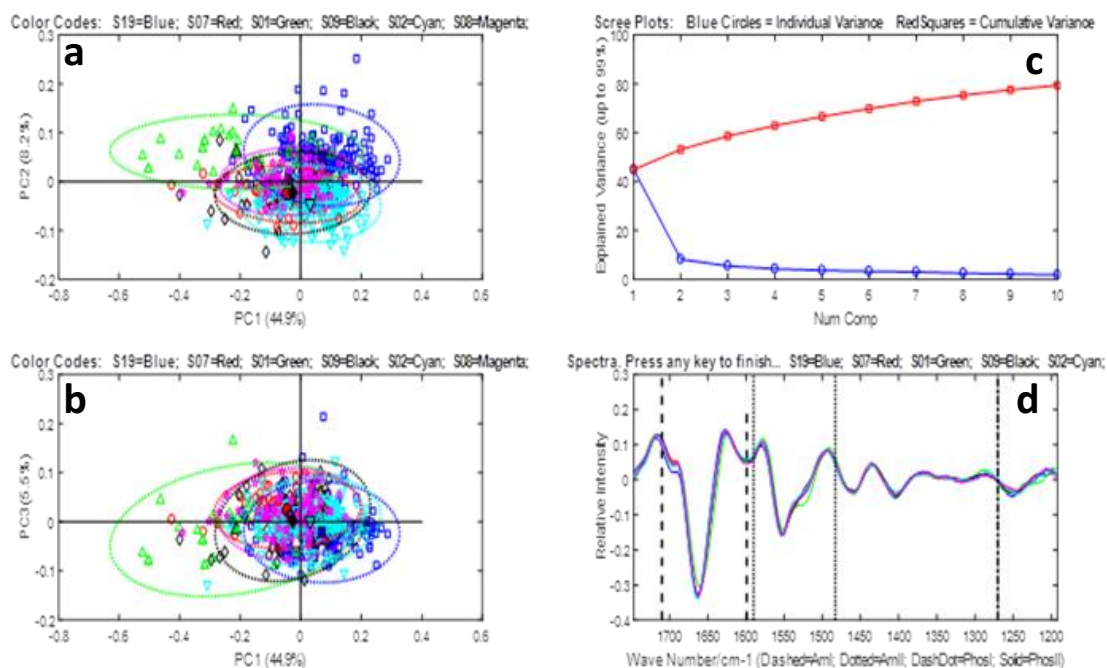


Figura 2.9: Resultados de PCA en la región de Amida I, Amida II, Amida III y Ácidos Nucleicos (952-1748 cm^{-1}): (a) PC2 vs. PC1, (b) PC3 vs. PC1, (d) media de los espectros derivados de segundo orden de las siguientes muestras: células HeLa no irradiadas (azul) e irradiadas (rojas) sin la adición de Rf o PecAgNP en el medio de incubación (controles); células HeLa irradiadas pre-incubadas con Rf 50 μM (magenta), células HeLa irradiadas pre-incubadas con 1 μM M PecAgNP (negro), células HeLa irradiadas pre-incubadas con Rf 50 μM y PecAgNP 1 μM (turquesa), y células HeLa irradiadas pre-incubadas con TMPyP 10 μM para comparación (verde). Las líneas verticales muestran los números de onda esperados para los picos de α -hélice (1654 cm^{-1}), hoja- β (1632 cm^{-1}) y estructuras desordenada (1641 cm^{-1}) (30–32); (c) gráfico de sedimentación: varianza individual (azul) y varianza acumulada (rojo).

Conclusiones parciales

- Por técnicas de fluorescencia, logramos demostrar el ingreso de la Rf en el medio de cultivo a la célula.
- Se demostró por medidas de toxicidad celular, que ni la Rf, ni las PecAgNP, fueron tóxicas en las concentraciones utilizadas, en oscuridad.
- Demostramos que la incubación de células HeLa en un medio celular normal, el cual contiene adicionalmente Rf y PecAgNP, resultó en un efecto fotodinámico mayor, en comparación con la adición de solo Rf (ver Figura 2.4). Esto se interpreta como una consecuencia de la presencia de Rf y PecAgNP en el mismo microambiente celular. De acuerdo con los resultados del capítulo previo proponemos que el complejo entre Rf y PecAgNP es el responsable de este comportamiento.
- Las células HeLa irradiadas, pre-incubadas con Rf, arrojaron un resultado positivo solo al ensayo de Anexina V, lo que nos indica un mecanismo de muerte celular de apoptosis temprana. Al ser incubadas con Rf y PecAgNP en el medio de cultivo, tanto el ensayo de Anexina V, como el de PI fueron positivos, lo que nos indica un mecanismo de muerte celular por apoptosis tardía o necrosis.
- Los espectros SR-FTIR de las células HeLa pre-incubadas con Rf y/o PecAgNP no mostraron cambios después del tratamiento con PDT. Solo las células incubadas con el fotosensibilizador TMPyP mostraron cambios en los espectros SR-FTIR.
- Se debe considerar que los ensayos MTT reflejan la actividad mitocondrial, los de RN la actividad lisosómica y la microespectroscopía SR-FTIR analiza los cambios estructurales globales de las moléculas biológicas en los núcleos de las células. En las condiciones de nuestros experimentos, estas últimas alteraciones se detectaron solo cuando se usó TMPyP como sensibilizador, pero no con Rf. Esto podría estar relacionado con la localización diferente de TMPyP y Rf. La porfirina se acumula en el núcleo de la célula (33), mientras que los compartimentos endocíticos están implicados en la captación y el tráfico intracelular de Rf (34).

Bibliografía

1. Juarranz Á, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clinical and Translational Oncology*. 2008; 10(3):148–154.
2. Savarimuthu WP, Gananathan P, Rao AP, Manickam E, Singaravelu G. Protoporphyrin IX-Gold Nanoparticle Conjugates for Targeted Photodynamic Therapy—An In-Vitro Study. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2015; 15(8):5577–5584.
3. Eshghi H, Sazgarnia A, Rahimizadeh M, Attaran N, Bakavoli M, Soudmand S. Protoporphyrin IX-gold nanoparticle conjugates as an efficient photosensitizer in cervical cancer therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. Elsevier B.V.; 2013; 10(3):304–312.
4. García Calavia P, Chambrier I, Cook MJ, Haines AH, Field RA, Russell DA. Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using lactose-phthalocyanine functionalized gold nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2018; 512:249–259.
5. Haimov E, Weitman H, Polani S, Schori H, Zitoun D, Shefi O. mTHPC- conjugated Gold Nanoparticles as a Tool to Improve Photodynamic Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2018; 10 (3): 2319–2327.
6. Nagy-Simon T, Potara M, Craciun AM, Licarete E, Astilean S. IR780-dye loaded gold nanoparticles as new near infrared activatable nanotheranostic agents for simultaneous photodynamic and photothermal therapy and intracellular tracking by surface enhanced resonant Raman scattering imaging. *Journal of Colloid and Interface Science*. Elsevier Inc.; 2018; 517:239–250.
7. Gamaleia NF, Shishko ED, Dolinsky GA, Shcherbakov AB, Usatenko A V., Kholin V V. Photodynamic activity of hematoporphyrin conjugates with gold nanoparticles: Experiments in vitro. *Experimental Oncology*. 2010; 32(1):44–47.
8. Kang SH, Nafiujjaman M, Nurunnabi M, Li L, Khan HA, Cho KJ, Huh KM, Lee Y. Hybrid photoactive nanomaterial composed of gold nanoparticles, pheophorbide-A and hyaluronic acid as a targeted bimodal phototherapy. *Macromolecular Research*. 2015; 23(5):474–484.
9. Penon O, Marín MJ, Russell DA, Pérez-García L. Water soluble, multifunctional antibody-porphyrin gold nanoparticles for targeted photodynamic therapy. *Journal of Colloid and Interface Science*. Elsevier Inc.; 2017; 496:100–110.
10. Gao F, Zheng W, Gao L, Cai P, Liu R, Wang Y, Yuang Q, Zhao Y, Gao X. Au Nanoclusters and Photosensitizer Dual Loaded Spatiotemporal Controllable Liposomal Nanocomposites Enhance Tumor Photodynamic Therapy Effect by Inhibiting Thioredoxin Reductase. *Advanced Healthcare Materials*. 2017;6(7).

11. Savarimuthu WP, Gananathan P, Rao AP, Manickam E, Singaravelu G. Protoporphyrin IX-Gold Nanoparticle Conjugates for Targeted Photodynamic Therapy—An In-Vitro Study. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2015; 15(8):5577-5584.
12. Escalada JP, Pajares A, Gianotti J, Biasutti A, Criado S, Molina P, Massad W, Amat-Guerri F, García NA. Photosensitized degradation in water of the phenolic pesticides bromoxynil and dichlorophen in the presence of riboflavin, as a model of their natural photodecomposition in the environment. *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier B.V.; 2011; 186(1):466–472.
13. Abrahamse H, Hamblin MR, Moan J, Peng Q, Agostinis P, Berg K. New photosensitizers for photodynamic therapy. *The Biochemical journal*. 2016; 473(4):347–364.
14. Palma PFR, Baggio GL, Spada C, Silva RD a, Ferreira SI a CP, Treitinger A. Evaluation of annexin V and Calcein-AM as markers of mononuclear cell apoptosis during human immunodeficiency virus infection. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2008; 12:108–114.
15. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium- mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272(42):26159-26165.
16. Arur S, Uche UE, Rezaul K, Fong M, Scranton V, Cowan AE, Mohler W, Han DK. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Developmental Cell*. 2003; 4(4):587-598.
17. Pozarowski P, Grabarek J, Darzynkiewicz Z. Flow Cytometry of Apoptosis. *Current Protocols in Cell Biology*. 2004. 21(1): 1881.
18. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*. 1995; 184(95):39–51.
19. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 2007; 35(4):495-516.
20. Yang Y, Xiang Y, Xu M. From red to green: The propidium iodide-permeable membrane of *Shewanella decolorationis* S12 is repairable. *Scientific Reports*. Nature Publishing Group; 2015; 5(December):2–6.
21. Zhivotovsky B, Orrenius S. Current concepts in cell death. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino*. 2001.
22. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Haskó G, Hawkins BJ, Madesh M, Pacher P. Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nature Protocols*. 2007;

2(9):2295-301.

23. Gasser J-P, Hehl M, Millward T. A homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer assay for phosphatidylserine exposure on apoptotic cells. *Analytical biochemistry*. 2009; 384(1):49-55
24. Bosio GN, Breitenbach T, Parisi J, Reigosa M, Blaikie FH, Pedersen BW, Silva EFF, Martire DO, Ogilby PR. Antioxidant β -carotene does not quench singlet oxygen in mammalian cells. *Journal of the American Chemical Society*. 2013; 135(1):272–279.
25. Bosio GN, Parisi J, García Einschlag FS, Mártire DO. Imidazole and beta-carotene photoprotection against photodynamic therapy evaluated by synchrotron infrared microscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2018; 195: 53-61.
26. Miller LM, Dumas P. From structure to cellular mechanism with infrared microspectroscopy. *Current Opinion in Structural Biology*. 2010; 20(5):649-656.
27. Dumas P, Sockalingum GD, Sulé-Suso J. Adding synchrotron radiation to infrared microspectroscopy: what's new in biomedical applications? *Trends in Biotechnology*. 2007; 25(1):40–44.
28. Chio-Srichan S, Réfrégiers M, Jamme F, Kascakova S, Rouam V, Dumas P. Photosensitizer effects on cancerous cells: A combined study using synchrotron infrared and fluorescence microscopies. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 2008; 1780(5):854-860.
29. Mitri E, Kenig S, Coceano G, Bedolla DE, Tormen M, Greci G, Vaccari L. Time-Resolved FT-IR Microspectroscopy of Protein Aggregation Induced by Heat-Shock in Live Cells. *Analytical Chemistry*. 2015; 87(7):3670–3677.
30. Oreopoulos J, Berman R, Browne M. Chapter 9 – Spinning-disk confocal microscopy: present technology and future trends. *Methods in Cell Biology*. 2014.
31. Gasparri F, Muzio M. Monitoring of apoptosis of HL60 cells by Fourier-transform infrared spectroscopy. *The Biochemical journal*. 2003; 369(Pt 2): 239–248.
32. André W, Sandt C, Dumas P, Djian P, Hoffner G. Structure of inclusions of huntington's disease brain revealed by synchrotron infrared microspectroscopy: Polymorphism and relevance to cytotoxicity. *Analytical Chemistry*. 2013; 85(7):3765–3773.
33. Bosio GN, Parisi J, García Einschlag FS, Mártire DO. Imidazole and beta-carotene photoprotection against photodynamic therapy evaluated by synchrotron infrared microscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2018; 195:53-61.
34. Huang S-N, Phelps M a, Swaan PW. Involvement of endocytic organelles in the subcellular trafficking and localization of riboflavin. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2003; 306(2):681–687.

Capítulo 3

Capítulo 3

Efecto de Nanopartículas de Oro cubiertas con Pectina sobre la fotofísica de la Riboflavina

***“La vida es una preparación para el futuro; y la mejor preparación para el futuro es
vivir como si no hubiera ninguno.”***

Albert Einstein

Ya hemos hablado en varias secciones de los beneficios de utilizar una combinación de nanopartículas metálicas, por su interesante fenómeno de LSPR(1), con fotosensibilizadores orgánicos, para aumentar la eficiencia de estos últimos en PDT. Mencionamos además que otros autores habían demostrado el aumento de producción de oxígeno singlete usando Rf como fotosensibilizador cuando este se encontraba en presencia de nanopartículas de plata estabilizadas con pectina (2).

Como demostramos en el Capítulo 1, las PecAgNP formaron un complejo con nuestro fotosensibilizador, la Rf, el cual logró aumentar la producción de $O_2(^1\Delta g)$ y $O_2^{\cdot-}$.

Además, en el Capítulo 2, evidenciamos que la incubación de células HeLa en un medio celular normal, el cual contiene adicionalmente Rf y PecAgNP, resultó en un efecto fotodinámico mayor, en comparación con la adición de solo Rf.

Debido a los resultados obtenidos, decidimos utilizar con el mismo objetivo de incrementar el efecto de la Rf en PDT, otro tipo de nanopartículas metálicas estabilizadas con el mismo polímero que las nanopartículas de plata empleadas. Para ello sintetizamos y caracterizamos nanopartículas de oro cubiertas con pectina (PecAuNP) y las empleamos para evaluar su efecto sobre la fotofísica de nuestro fotosensibilizador.

Síntesis de las PecAuNP

Un método descrito previamente en bibliografía fue utilizado para la síntesis de las nanopartículas de oro (3). La pectina, al igual que en la síntesis de las PecAgNP, actúa como agente reductor y estabilizante de las PecAuNP. La única diferencia con respecto a la síntesis de Nigoghossian et. al., fue que, en lugar de pectina de cáscara de naranja, se utilizó pectina de cáscara de manzana.

Se preparó una solución acuosa de pectina 0.5% p/v bajo agitación durante 2 h a 80°C. 3 mL de esta solución fueron agregados junto a 3 mL de una solución 1mM de HAuCl_4 24 mL de agua bidestilada, bajo intensa agitación. La solución se mantuvo a 80°C hasta cambio de color de transparente a rosado, momento en el cual se dio por terminada la síntesis.

Caracterización de las PecAuNP

Mediante el uso de microscopía electrónica de transmisión pudo observarse que las nanopartículas tienen mayoritariamente forma esférica. Gracias al recuento de una cantidad de nanopartículas estadísticamente significativa, se realizó el histograma de distribución de tamaños mostrado en la Figura 3.1, que arrojó como resultado un diámetro promedio de 17 ± 7 nm.

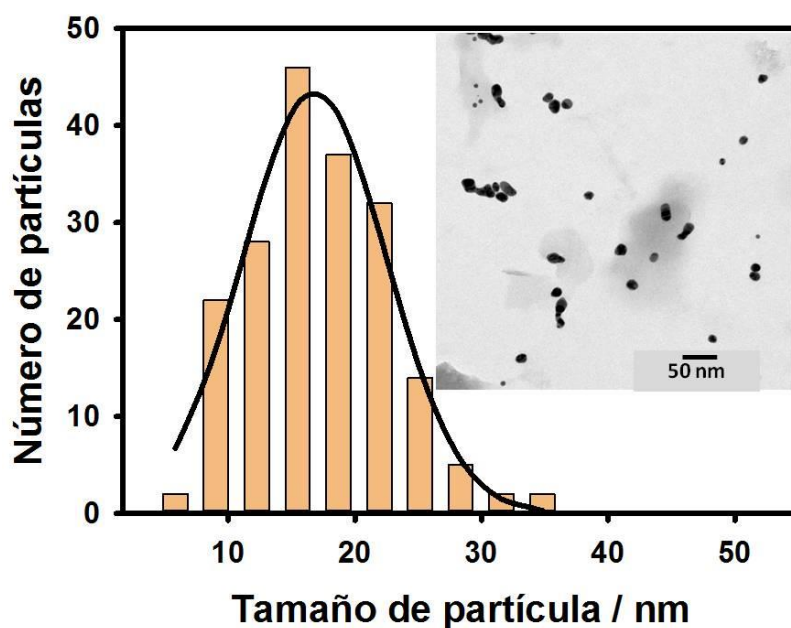


Figura 3.1: Histograma de distribución de tamaños de las PecAuNP. Inset: Fotografía de TEM de las PecAuNP.

La espectroscopía de absorción UV-Visible (ver Figura 3.2) nos permitió determinar que la posición del máximo de la banda de resonancia del plasmón de las PecAuNP se encuentra a 541 nm. El espectro de absorción se obtuvo utilizando un modelo teórico, donde se calculó el scattering como la suma de un componente de dispersión ($a + c/\lambda^n$) que se ajusta a la región de mayores longitudes de onda ($\lambda > 700$ nm) y se extrapoló a la región UV (4), como se muestra en la Figura 3.2.

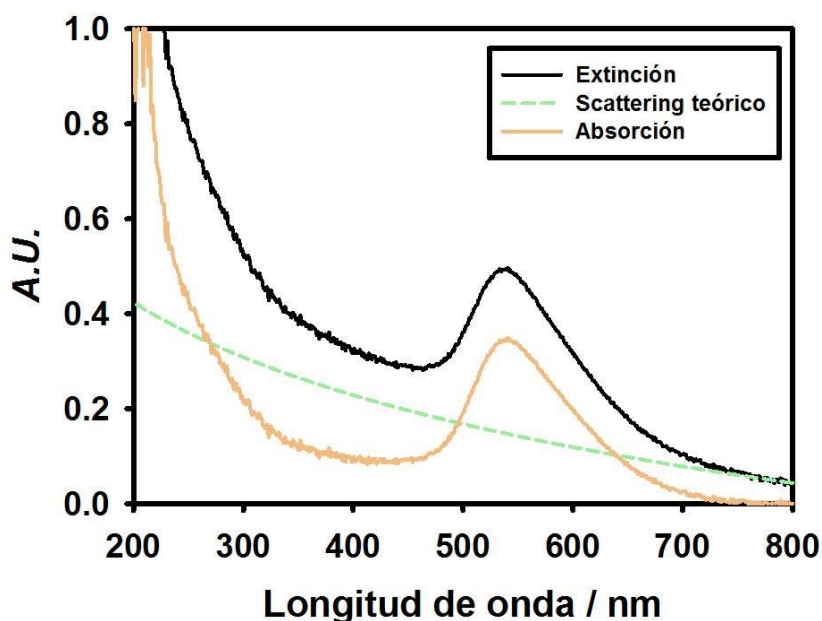


Figura 3.2: Espectros de absorción, extinción y scattering UV-Visible de las PecAgNP.

Medidas de potencial Z de la solución de nanopartículas entre los pH 4 y 11, muestran un valor negativo de carga superficial, como puede verse en la

Figura 3.3, confirmando el efectivo recubrimiento de las nanopartículas de oro por la pectina, ya que para nanopartículas de oro desnudas el potencial Z es cero a distintos valores de pH (5).

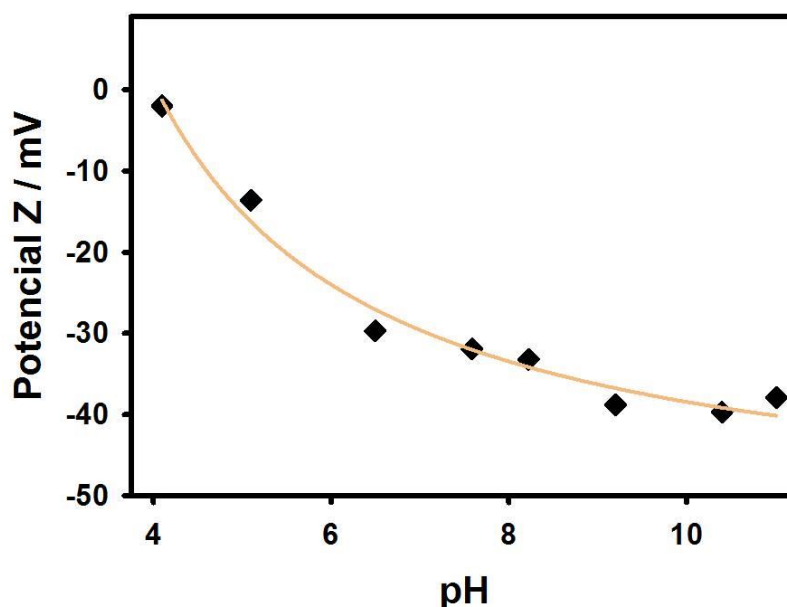


Figura 3.3: Medidas de potencial Z de las PecAuNP en función del pH.

Interacción de las PecAuNP con la Riboflavina en estado basal

Nuevamente, las concentraciones de nanopartículas y de riboflavina utilizadas en los ensayos fotoquímicos, fueron elegidas de manera que la radiación sea mayormente absorbida por la riboflavina (la absorción de las PecAuNP a la longitud de onda de excitación, al igual que con las PecAgNP, fue de al menos 10 veces menor que la de la Rf).

La posible formación de un complejo en estado basal entre la Rf y las PecAuNP fue evaluada mediante espectroscopía de absorción UV-Visible.

De igual manera que con las PecAgNP, antes de realizar algún tipo de análisis, nos aseguramos de que exista un cambio verdadero en los espectros de absorción de la mezcla de Rf y PecAuNP, con respecto a la suma de los espectros de la Rf y las PecAuNP por separado. A diferencia de las nanopartículas de plata, no se encontraron diferencias entre los espectros de absorción de las mezclas Rf y PecAuNP con los espectros sumas de la Rf con los de las PecAuNP en las mismas concentraciones (resultados no mostrados), por lo que mediante espectroscopía UV-Visible no es posible obtener información sobre la posible formación de un complejo en estado basal. En caso de formarse no implicaría cambios en los coeficientes de absorción de la Rf.

Efecto de las PecAgNP en la fluorescencia de la Riboflavina

Se midió el tiempo de vida de fluorescencia de la riboflavina frente a distintas concentraciones de PecAuNP. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.1. El tiempo de vida de fluorescencia permaneció constante en todos los tratamientos e igual a 4.7 ± 0.2 ns. Estos resultados, al igual que los obtenidos con las PecAgNP, descartan la posibilidad de un proceso de quenching dependiente de colisión en las condiciones de trabajo.

[Au] / μM	τ / ns
0	4,72
0,046	4,71
0,068	4,71
0,079	4,72
0,091	4,72
0,118	4,71
0,158	4,71
0,455	4,73
0,683	4,73
0,788	4,71
0,911	4,70
4,55	4,70

Tabla 3.1: Tiempos de vida de fluorescencia de la Rf frente a distintas concentraciones de PecAuNP.

La medida de los espectros de emisión ($\lambda^{\text{exc}} = 420$ nm) en estado estacionario de la Rf (16 mM) fue realizada frente a distintas cantidades de nanopartículas.

Para poder determinar cuál es el efecto de la adición de las nanopartículas debemos descartar los posibles efectos de filtro interno tanto a las longitudes de onda de excitación (λ^{exc}) como de emisión (λ^{em}). Estos efectos se tuvieron en cuenta corrigiendo la intensidad registrada a cada longitud de onda de emisión mediante la ecuación 3.1:

$$F_{\text{cor}} = F_{\text{obs}} 10^{(Abs_{\text{exc}} + Abs_{\text{em}}) / 2}$$

Ecuación 3.1

Donde F_{cor} e F_{obs} son respectivamente las intensidades de emisión corregidas y medidas, Abs_{exc} y Abs_{em} son respectivamente las absorbancias de PecAgNP a λ^{exc} y λ^{em} y el factor 2 supone que la absorción y la emisión tienen lugar en el centro de la celda.

Los resultados que se muestran en la Figura 3.4 no evidencian ningún efecto de quenching. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos por TCSPC que eliminan la posibilidad de quenching dinámico. Además, se descarta la formación de un complejo no fluorescente en estado basal (quenching estático), porque en ese caso la intensidad de fluorescencia de Rf debería disminuir en presencia de PecAuNP.

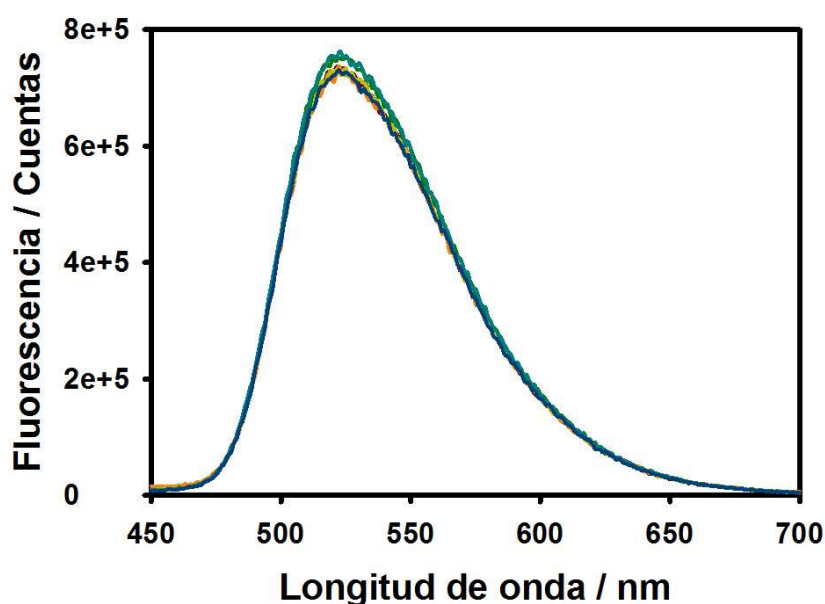


Figura 3.4: Espectro de emisión de fluorescencia de la Rf (16μM) en ausencia (marrón) y presencia de distintas cantidades de PecAuNP. Las concentraciones de Au son: 5 μM (naranja), 1 μM (verde claro), 0.75 μM (verde oscuro), 0.50 μM (azul) y 0.10 μM (violeta).

Experimentos de Láser Flash Fotólisis

Los experimentos de LFP para este sistema fueron realizados bajo atmósfera de Ar y excitando las muestras a 355 nm.

A los espectros obtenidos en estas medidas, tanto en presencia como en ausencia de PecAuNP, se les realizó un ajuste con 4 componentes.

En la Figura 3.5, se muestran los EADS obtenidos para la componente más rápida (5.5 ns). Estos cambios de absorbancia son negativos para todo el rango de longitudes de onda medidas. Esta componente, por lo tanto, puede ser asignada al estado S_1 de la Rf, el cual muestra una absorción del estado excitado por debajo de 480 nm que luego da lugar al primer estado excitado triplete de la Rf (6).

No se observaron cambios en los tiempos de vida de esta especie, ni en los espectros obtenidos para la misma en presencia de las PecAuNP (Figura 3.5). La asignación de esta componente al estado S_1 de la Rf está de acuerdo con el tiempo de vida de fluorescencia medido en los ensayos de TCSPC (4.7 ns) en presencia y ausencia de las nanopartículas de oro.

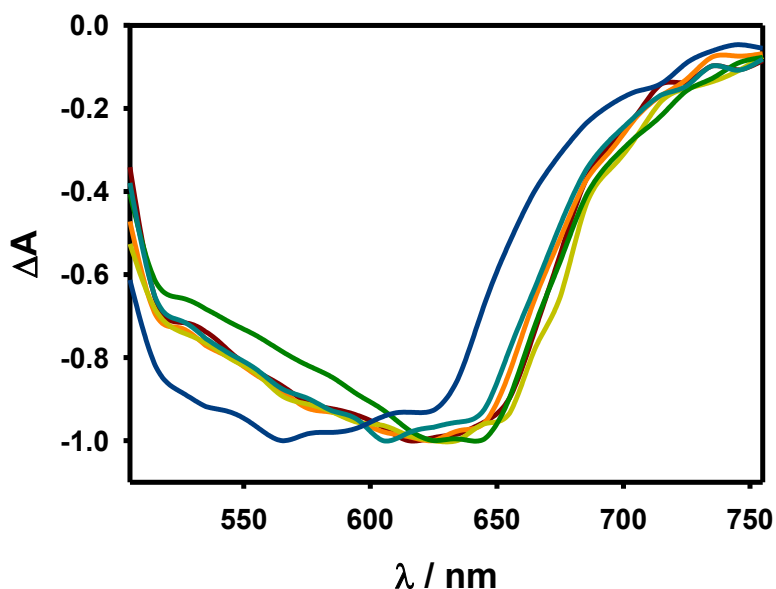


Figura 3.5: EADS obtenidos para la primer componente luego de la excitación de Rf (53 μM) en ausencia (línea bordo) y presencia de 1 μM de Au (línea naranja), 5 μM de Au (línea verde claro), 7.5 μM de Au (línea verde oscuro), 10 μM de Au (línea celeste) y 50 μM de Au (línea azul).

Para la segunda componente, con un tiempo de vida de 4.89 μs , se obtuvieron los EADS mostrados en la Figura 3.6.

Por comparación con el espectro teórico obtenido de literatura (7) (línea rayada en la Figura 3.6), este espectro fue asignado a la absorción triplete-triplete de la Rf.

Los espectros obtenidos en presencia de las PecAuNP no difieren con respecto al espectro de la Rf sola, lo que nos indica que la presencia de las nanopartículas no afecta la formación del estado triplete de la Rf.

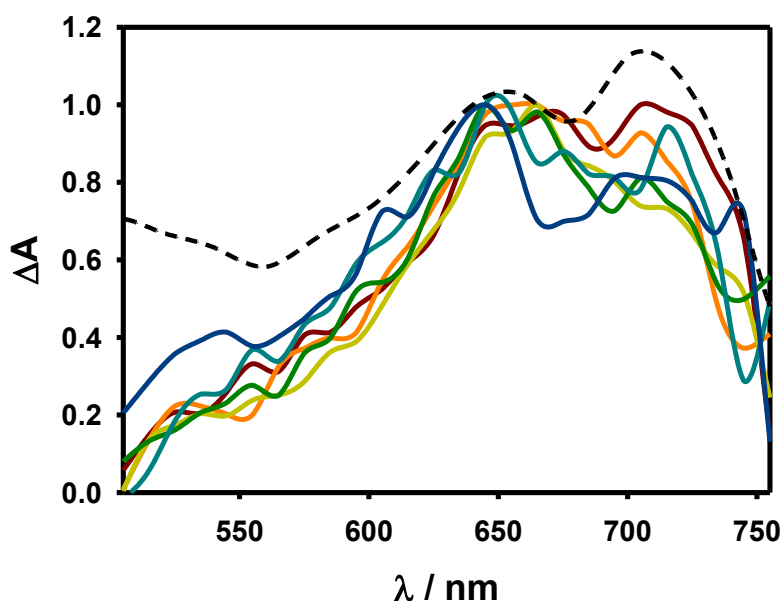


Figura 3.6: EADS obtenidos para la segunda componente luego de la excitación de Rf (53 μM) en ausencia (línea bordo) y presencia de 1 μM de Au (línea naranja), 5 μM de Au (línea verde claro), 7.5 μM de Au (línea verde oscuro), 10 μM de Au (línea celeste) y 50 μM de Au (línea azul). Se presenta además el espectro de absorción triplete-triplete de la Rf (línea negra rayada) obtenido de literatura (7).

Para la tercera componente, el tiempo de vida fue 13.8 μs , y se obtuvieron los EADS mostrados en la Figura 3.7.

Podríamos preguntarnos si sería viable la transferencia de un electrón desde las nanopartículas al estado triplete de la Rf ($^3\text{Rf}^*$). Mediante la Ecuación 1.3 del Capítulo 1 puede calcularse el valor de $\Delta_{\text{ET}}G^\circ$ para ese proceso con $E^\circ(\text{Rf}/\text{Rf}^\cdot) = -0.546$ (8), $E^\circ(\text{Au}^+/\text{Au}^0) = 1.69$ V (9) y $\Delta E_{0,0} = 209$ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (10). El resultado obtenido es $\Delta_{\text{ET}}G^\circ = +6.8$ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, lo que indica que el proceso no es termodinámicamente favorable.

Como se observa en la Figura 3.7, en ausencia de nanopartículas, el espectro correspondiente a la muestra de Rf es similar al espectro de absorción del radical catión de la Rf (línea negra rayada). En cambio, en presencia de nanopartículas, a medida que aumentamos la concentración de las mismas, el espectro se va asemejando cada vez más al del radical neutro de la Rf. Esto nos indicaría que en presencia de las PecAuNP el radical neutro aparecería a tiempos menores, en comparación a lo que ocurre cuando solo tenemos Rf.

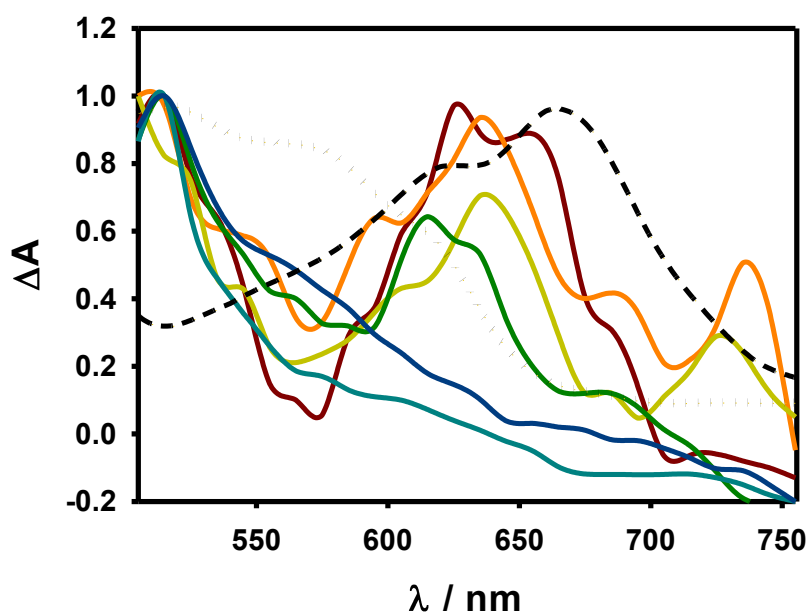
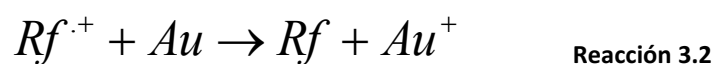


Figura 3.7: EADS obtenidos para la tercer componente luego de la excitación de Rf (53 μM) en ausencia (línea bordo) y presencia de 1 μM de Au (línea naranja), 5 μM de Au (línea verde claro), 7.5 μM de Au (línea verde oscuro), 10 μM de Au (línea celeste) y 50 μM de Au (línea azul). Se presenta además el espectro de absorción del radical catión de la Rf (línea negra rayada) y del radical neutro (línea punteada) de la Rf obtenidos de literatura (7).

De acuerdo con estos resultados, propusimos la siguiente reacción como posible mecanismo para la disminución de la absorción de la especie $\text{Rf}^{\cdot+}$ en presencia de las PecAuNP:



El cambio de energía estándar de Gibbs $\Delta_{\text{ET}}G^\circ$ para la reacción de transferencia de carga 3.1, puede calcularse con la Ecuación 3.2. Esta ecuación se utilizó para verificar si las PecAuNP pueden actuar donando electrones según la Reacción 3.1.

$$\Delta_{\text{ET}}G^\circ = N_A (eE^\circ(S^+ / S) - eE^\circ(\text{Rf}^{\cdot+} / \text{Rf})) \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Para este sistema, S^+ es Au^+ y S es Au , y se utilizarán los valores reportados para $E^\circ(\text{Rf}^{\cdot+} / \text{Rf}) = 2.28 \text{ V}$ (11) y $E^\circ(\text{Au}^+ / \text{Au}^0) = 1.69 \text{ V}$ (9). Se obtiene un valor de $\Delta_{\text{ET}}G^\circ = -56,9 \text{ kJmol}^{-1}$ para la reacción, confirmando la factibilidad de este proceso.

Para la cuarta componente, de tiempo de vida de 148.5 μs , se obtuvieron los EADS mostrados en la Figura 3.8. Por comparación con el espectro del radical neutro,

presentado también en la figura, los espectros obtenidos tanto en ausencia como en presencia de PecAuNP, son asignados a esta especie.

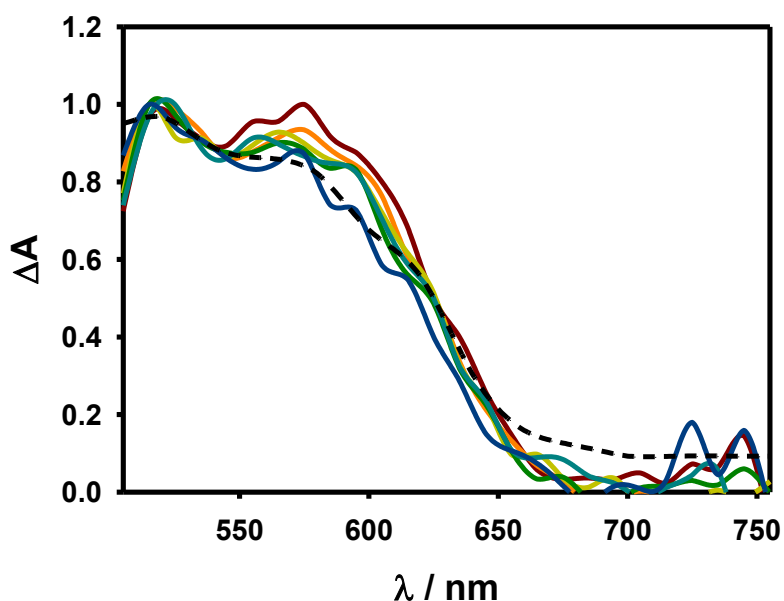


Figura 3.8: EADS obtenidos para la cuarta componente luego de la excitación de Rf (53 μM) en ausencia (línea bordo) y presencia de 1 μM de Au (línea naranja), 5 μM de Au (línea verde claro), 7.5 μM de Au (línea verde oscuro), 10 μM de Au (línea celeste) y 50 μM de Au (línea azul). Se presenta además el espectro de absorción del radical neutro de la Rf obtenido de literatura (7).

Para poder cuantificar los cambios en el rendimiento de formación del estado triplete de la Rf en presencia de las PecAuNP, se graficó en la Figura 3.9 la relación entre los cambios de absorbancias a 710 nm a un tiempo de 1 μs en presencia de nanopartículas (ΔA^{710}) y en ausencia de las mismas (ΔA^{710}_0), ambos obtenidos de los experimentos de LFP, vs. la concentración de Au.

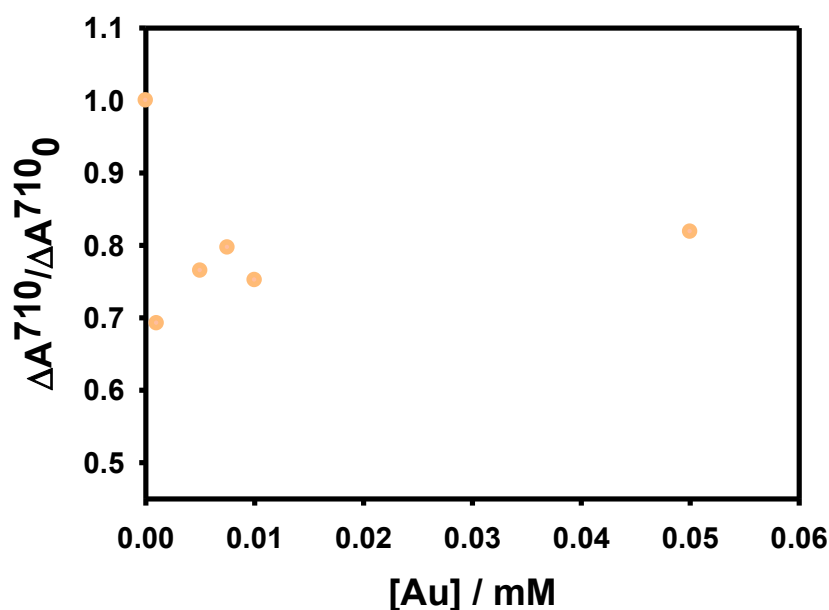


Figura 3. 9: Gráfico de $\Delta A^{710} / \Delta A^{710}_0$ vs [Au].

Como podemos observar en la Figura 3.9, existe una leve disminución en la absorbancia del triplete de la Rf en presencia de las PecAuNP, que no presenta ninguna tendencia que se relacione con las concentraciones agregadas de nanopartículas.

Efecto de las PecAuNP en la generación de ROS por parte de la Rf

Como ya discutimos en el Capítulo 1, en condiciones aeróbicas, la transferencia de energía de $^3Rf^*$ al oxígeno en su estado fundamental (3O_2) da lugar a la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ (ver esquema 1.2 en el Capítulo 1).

Como consecuencia de la disminución observada en la absorbancia del estado triplete de la Rf (Figura 3.9), esperaríamos obtener una leve disminución en la cantidad de oxígeno singlete formado en presencia de PecAuNP en comparación a la que obtenemos en ausencia de las mismas por parte de la Rf. Para comprobarlo graficamos la intensidad (I_0) obtenida de los ajustes de los decaimientos de la fosforescencia de oxígeno singlete vs diferentes potencias del Láser (355 nm).

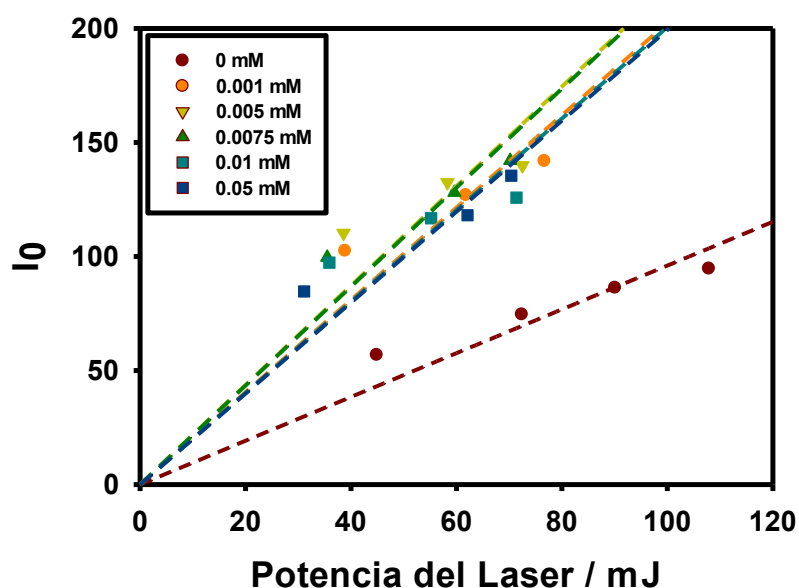


Figura 3. 10: Gráfico que muestra la intensidad (I_0) de las señales obtenidas para la fosforescencia de oxígeno singlete de la Rf en presencia de distintas cantidades de PecAuNP vs diferentes potencias del láser. La concentración de Au se muestra en el recuadro.

Como podemos ver en la Figura 3.10, a diferencia de lo esperado, en presencia de nanopartículas la intensidad inicial en la fosforescencia de oxígeno singlete se ve aumentada (sin seguir ninguna tendencia en función de la concentración), lo que disiente con los resultados obtenidos para la absorción del estado triplete de la Rf en los cuales vemos una leve disminución de la misma.

El aumento de la intensidad de fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ en presencia de nanopartículas, según un trabajo de Bregnhøj et. al (12), puede deberse a la dispersión de luz que generan las partículas en el medio. El incremento en la fosforescencia de oxígeno singlete observado en la Figura 3.10 en presencia de PecAuNP, podría, por lo tanto, no ser más que un efecto óptico debido a un cambio en la propagación de la luz a través de la muestra por la dispersión generada por las nanopartículas. Podríamos aplicar el mismo argumento para justificar el aumento de intensidad de la señal de fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ en presencia de PecAgNP (ver Figura 1.16 del Capítulo 1). Sin embargo, en ese último caso el aumento de la intensidad de la señal es mucho mayor y además está acompañado por un incremento en la producción de estados triplete del sensibilizador (Figura 1.15) y de otra ROS que se forma a partir de los estados triplete: H_2O_2 (Figura 1.17). Además, los ensayos biológicos del Capítulo 2 apoyan el incremento de la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ por parte de la Rf en presencia de PecAgNP.

Como se informó en el Capítulo 1, la Rf también produce $O_2^{\cdot-}$ el cual da lugar a la formación de H_2O_2 .

Como la vía de formación del radical $O_2^{\cdot-}$, proviene de la interacción del oxígeno molecular con el radical anión de la Rf, y esta vía no se encuentra afectada por la presencia de PecAuNP, esperaríamos ver que la cantidad de H_2O_2 producida no varíe en presencia de las distintas concentraciones de nanopartículas.

Efectivamente, como se ve en la Figura 3.11, la concentración de agua oxigenada no se ve afectada en presencia de nanopartículas de oro.

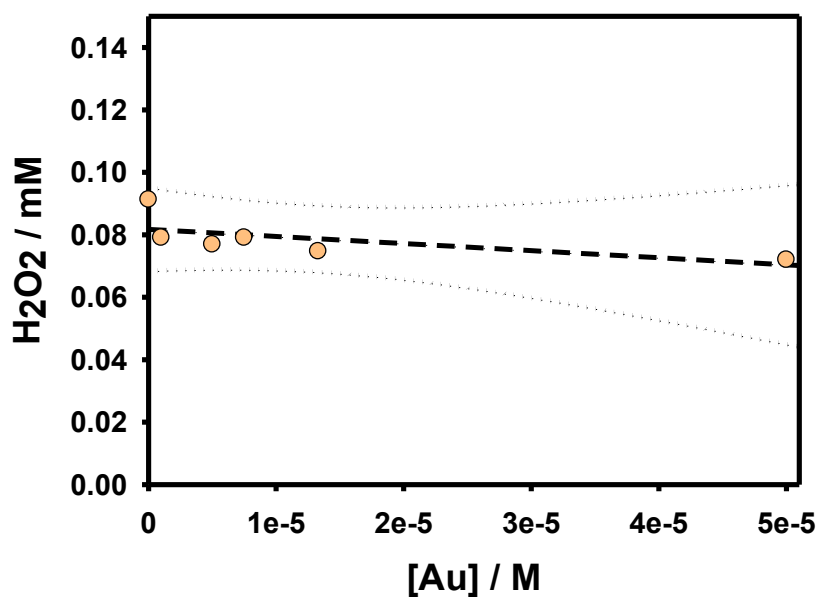


Figura 3. 11: Gráfico de $[H_2O_2]$ vs $[Au]$. La concentración de Rf utilizada fue $0.54 \mu M$.

Conclusiones Parciales

- En las condiciones de trabajo la espectroscopía UV-visible no mostró evidencia de la formación de un complejo entre la Rf y las PecAuNP.
- En los ensayos de fluorescencia estacionaria no se observó una disminución de los espectros de fluorescencia de la Rf por la presencia de las PecAuNP. A su vez, el tiempo de vida de fluorescencia, medido por TC-SPC, permaneció constante en presencia de las nanopartículas. Estos resultados indican que no hay existencia de quenching dinámico ni estático de fluorescencia.
- Mediante los ensayos de LFP con excitación a 355 nm, pudimos observar que la presencia de PecAuNP afecta al radical catión de la riboflavina (Rf^+), disminuyendo su concentración por un proceso de transferencia de un electrón proveniente de las nanopartículas de oro. Si bien este efecto se observa en los espectros obtenidos (Figura 3.7), no lo vemos reflejado en los tiempos de vida, lo que podría deberse a que el programa utilizado para realizar los ajustes no logre separar los tiempos de vida del radical catión y el radical neutro de la Rf.
- Se ha demostrado en literatura, que complejos que generan de forma fotoquímica Au (I) presentan una importante actividad antibacteriana, con un gran potencial para combatir infecciones en la piel. Estos tipos de complejos de Au (I), fueron derivados de ligandos que a su vez exhiben propiedades antibacterianas por sí solos, lo que llevaría a un efecto sinérgico de ambas especies (13). Por lo tanto, sería interesante evaluar en el futuro si la Rf, con su capacidad de producir ROS, junto con nuestras PecAuNP, que producirían Au(I) por irradiación en presencia de Rf, mejorarían la capacidad antibacteriana de la Rf.
- Si bien se ve una leve disminución en la absorción del estado triplete de la Rf en presencia de PecAuNP, este mismo efecto no se ve reflejado en la cantidad de oxígeno singlete generado, esto podría deberse a que, en realidad, el aumento de la fosforescencia de oxígeno singlete observado, sería solo un fenómeno óptico producido por la dispersión de luz que generan las nanopartículas.
- La concentración de peróxido de hidrógeno no se mostró afectada en presencia de PecAuNP debido a que la vía de formación del mismo proviene de la interacción del oxígeno molecular con el radical anión de la Rf. La formación de este último no fue afectada por la presencia de las nanopartículas.

Bibliografía

1. Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Noble metals on the nanoscale: Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. *Acc Chem Res.* 2008; 41(12):1578-1586.
2. De Melo LSA, Gomes ASL, Saska S, Nigoghossian K, Messaddeq Y, Ribeiro SJL, De Araujo RE. Singlet oxygen generation enhanced by silver-pectin nanoparticles. *J Fluoresc.* 2012; 22(6):1633–8.
3. Nigoghossian K, Dos Santos M V., Barud HS, Da Silva RR, Rocha LA, Caiut JMA, De Assunção RMN, Spanhele L, Poulainf M, Messaddeq Y, Ribeiro SJL. Orange pectin mediated growth and stability of aqueous gold and silver nanocolloids. *Appl Surf Sci.* 2015; 341:28–36.
4. Ruiz AE, Caregnato P, Arce VB, Schiavoni MDLM, Mora VC, Gonzalez MC, Allegretti PE, Mártire DO. Synthesis and characterization of butoxylated silica nanoparticles. Reaction with benzophenone triplet states. *J Phys Chem C.* 2007; 111 (21): 7623–7628.
5. Kolb AND, Johnston JH. Synthesis and functionalisation of stable ‘ naked ’ gold nanoparticles. 2017; 14:179–90.
6. Orellana B, Rufs a M, Encinas M V, Previtali CM, Bertolotti S. The Photoinitiation Mechanism of Vinyl Polymerization by Riboflavin/Triethanolamine in Aqueous Medium. *Macromolecules [Internet].* 1999; 32(20):6570–3.
7. Li H, Melø TB, Razi Naqvi K. Triplets, radical cations and neutral semiquinone radicals of lumiflavin and riboflavin: An overhaul of previous pump-probe data and new multichannel absolute absorption spectra. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2012; 106(1):34–9.
8. Tan SLJ, Webster RD. Electrochemically induced chemically reversible proton-coupled electron transfer reactions of riboflavin (Vitamin B 2). *J Am Chem Soc.* 2012; 134(13):5954–64.
9. Bhagat S, Srikanth Vallabani N V., Shutthanandan V, Bowden M, Karakoti AS, Singh S. Gold core/ceria shell-based redox active nanozyme mimicking the biological multienzyme complex phenomenon. *J Colloid Interface Sci.* 2018; 513:831–42.
10. Porcal G, Bertolotti SG, Previtali CM, Encinas M V. Electron transfer quenching of singlet and triplet excited states of flavins and lumichrome by aromatic and aliphatic electron donors. *Phys Chem Chem Phys.* 2003; 5(19):4123.
11. Kimore K, Guha SN. Pulse radiolysis study of one electron oxidation of riboflavin. *Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.).* 1991; 38(1):119–25.
12. Bregnhøj M, Rodal-Cedeira S, Pastoriza-Santos I, Ogilby PR. Light Scattering versus Plasmon Effects: Optical Transitions in Molecular Oxygen near a Metal

Nanoparticle. J. Phys. Chem. C, 2018, 122 (27): 15625–15634.

13. Stenger-Smith J, Chakraborty I, Mascharak PK. Cationic Au(I) complexes with aryl-benzothiazoles and their antibacterial activity. J Inorg Biochem. 2018; 185(February):80–5.

Capítulo 4

Capítulo 4

Síntesis y caracterización de Nanoplatos de Plata. Estudio de sus propiedades fotofísicas.

*"Muere lentamente quien no viaja, quien no lee, quien no escucha música, quien no
halla encanto en sí mismo."*

Pablo Neruda

Como se habló en la introducción, la terapia fototérmica está basada en la exposición de una determinada parte del cuerpo a láseres infrarrojos cercanos (NIR) con el objetivo de producir calentamiento localizado para lograr la ablación térmica de las células cancerosas tras la irradiación (1).

Recientemente, las propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas han creado gran interés para su aplicación en este tipo de terapias. Cuando la luz se acopla con la frecuencia de oscilación de los electrones de conducción de la capa externa de las nanopartículas de metales nobles, surge la llamada resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR), que se manifiesta como una fuerte banda de absorción, junto a un efecto eficiente de conversión de luz a calor (2).

Si estas nanopartículas se lograran localizar en el tumor, las mismas podrían actuar como transductores fototérmicos convirtiendo la luz absorbida por LSPR en calor, lo que llevaría a una elevación localizada de la temperatura, lográndose así la eliminación celular terapéutica (3,4).

Con este fin decidimos sintetizar nanoplatos de plata estabilizados con polivinilpirrolidona (PVP) y polietilenglicol (PEG). Los mismos se caracterizaron y se evaluó la capacidad de generar aumentos de temperatura de sus suspensiones acuosas al ser irradiados por un láser a 800 nm.

En literatura, se ha propuesto que solo las nanoestructuras que tienen la superficie de Ag (111) expuesta, tales como decaedros de Ag y los nanoplatos de Ag (como los empleados en el presente trabajo) pueden fotosensibilizar la producción de $O_2(^1\Delta g)$ (5). Por esto mismo, se decidió medir la capacidad de suspensiones acuosas de los nanoplatos de generar oxígeno singlete por fosforescencia resuelta en el tiempo.

Síntesis de los Nanoplatos

Tres distintos tipos de nanoplatos fueron sintetizados a partir de métodos reportados en bibliografía y ciertas modificaciones de los mismos (6).

- Síntesis de nanoplatos de plata recubiertos de PVP (NP1): 24.50 mL de agua ultra pura, 50 μL de una solución acuosa de AgNO_3 (0.05 M), 500 μL de citrato de sodio (75 mM), 100 μL de PVP (17.5 mM), y 60 μL de peróxido de hidrógeno (30% p/p) se mezclaron y se agitaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego de procedió a una rápida inyección de 250 μL de NaBH_4 (100 mM).
- Síntesis de nanoplatos de plata recubiertos de PVP (NP2): Los mismos volúmenes de las soluciones de citrato de sodio y PVP de la síntesis de NP1 se mezclaron con 24.00 mL de agua ultra pura, 150 μL de una solución acuosa de nitrato de plata (0,05 M) y 260 μL de peróxido de hidrógeno (30% p/p). Después de agitar vigorosamente a temperatura ambiente, se inyectó rápidamente un volumen de 250 μL de NaBH_4 (300 mM).
- Síntesis de nanoplatos de plata revestidos con PEG (NP3): 24.14 mL de agua ultra pura, 50 μL de una solución acuosa de nitrato de plata (0.05 M), 500 μL de citrato trisódico (75 mM), 100 μL de PEG (17.5 mM) y 60 μL de peróxido de hidrógeno (30% en peso) fueron mezclados y agitados vigorosamente a temperatura ambiente durante 5 minutos. 150 μL de NaBH_4 (100 mM) fueron inyectados rápidamente.

Caracterización de los Nanoplatos

La Figura 4.1 muestra los espectros de absorción UV-Vis-NIR de las suspensiones de los nanoplatos. En los mismos puede observarse una alta absorbancia entre las regiones de 650 y 1450 nm, coincidente con las longitudes de onda de las ventanas biológicas (7). Por lo tanto, los nanomateriales podrían ser potenciales candidatos para su aplicación en PTT.

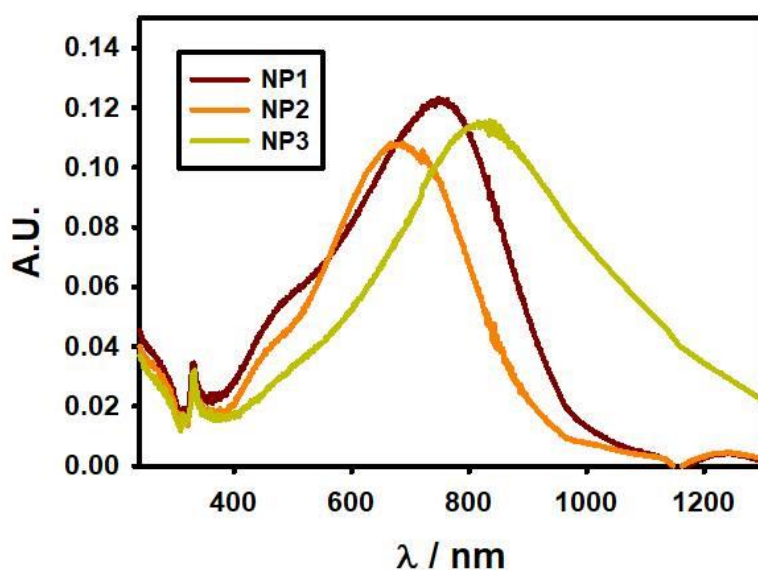


Figura 4.1: Espectros de absorción UV-Visible y NIR de las suspensiones acuosas de los tres nanoplatos en las concentraciones que resultan de las síntesis.

En la Figura 4.2 podemos observar las imágenes que se obtuvieron por TEM para los tres tipos de nanopartículas. De estas medidas pudimos interpretar que la síntesis de las nanopartículas proporciona un rendimiento de nanotriángulos de aproximadamente un 30% con una gran variedad de tamaños, además de una gran diversidad en tamaños y formas en el resto de las partículas. Esta polidispersidad está en línea con la amplia banda LSPR en el rango de 600-900 nm (ver Figura 4.1).

Por TEM tampoco se observó una cantidad significativa de nanopartículas de plata esféricas, lo que está de acuerdo con la ausencia de una banda de LSPR a aproximadamente 400 nm.

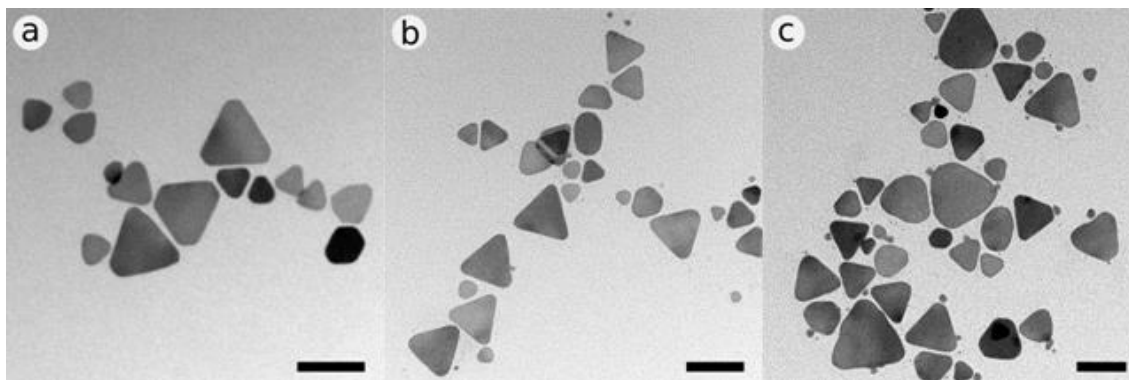


Figura 4.2: Imágenes de TEM de los nanoplatos: a) NP1, b) NP2 y c) NP3. La barra de escala en cada imagen corresponde a 50 nm.

Es interesante observar la alta monodispersidad en el grosor obtenido para los nanotriángulos, como se informó anteriormente para nanomateriales similares (6,8). Estos tipos de nanopartículas de Ag también se conocen comúnmente como nanopartículas "lamelares" debido a la gran cantidad de fallas de apilamiento en dirección $\langle 111 \rangle$, es decir, paralelas a las caras $\{111\}$ (8).

La estabilidad de las nanopartículas a lo largo del tiempo, es una propiedad muy importante para su posible uso en aplicaciones biológicas; algunos autores informaron que los nanotriángulos podrían remodelarse pocas horas después de su síntesis (9). Sin embargo, nosotros encontramos que los espectros UV-Vis-NIR de las suspensiones acuosas de estas nanopartículas almacenadas a temperatura ambiente permanecieron estables por períodos de hasta al menos 6 meses, respaldando la estabilidad de las mismas.

En la Figura 4.3 podemos ver los espectros FTIR obtenidos para las nanopartículas NP1 y NP2, y su comparación con el espectro puro de su estabilizante PVP.

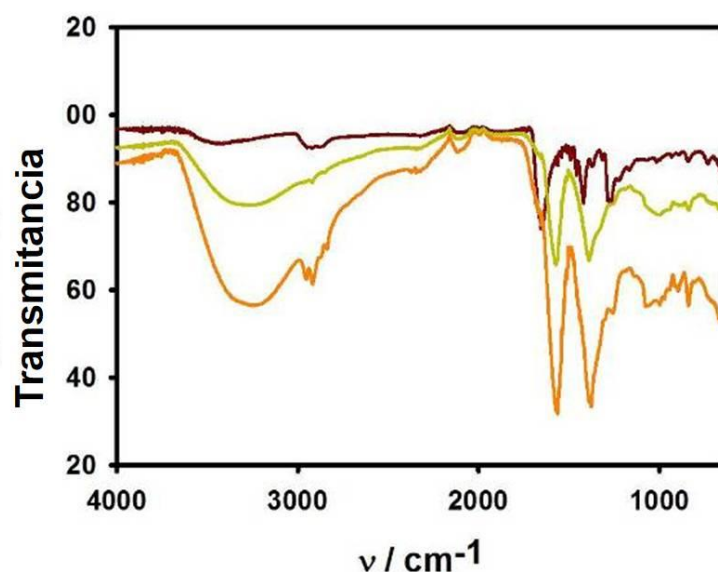


Figura 4.3: Espectros ATR-FTIR de: (a) PVP (marrón), NP1 (naranja) y NP2 (verde).

Esta figura muestra que la unión a Ag resulta en un cambio a números de onda menores de la banda de vibración de estiramiento del grupo C = O del PVP, que aparece a 1660 cm^{-1} para PVP libre y a 1560 cm^{-1} y 1575 cm^{-1} para NP1 y NP2, respectivamente. El mismo comportamiento fue observado también por Wang et al (10), quienes unieron PVP a nanomateriales Ag de diferentes formas, y asignaron la coordinación de los

átomos de Ag con los átomos de oxígeno de PVP. El pico a aproximadamente 890 cm^{-1} presente en los espectros de NP1 y NP2 se atribuye a la vibración del anillo de pirrolidona, que debe inclinarse sobre la superficie de las nanopartículas de plata (11). El pico a $\sim 2.950\text{ cm}^{-1}$ se asigna al estiramiento vibracional asimétrico de CH_2 en la cadena esquelética de PVP. Los picos de absorción característicos de los grupos C-H a 1.429 y 1.363 cm^{-1} para PVP aparecen como una banda más amplia con un máximo de 1383 cm^{-1} para NP1 y NP2. La vibración C-N a 1281 cm^{-1} para PVP se encuentra a 1257 cm^{-1} para NP1 y NP2.

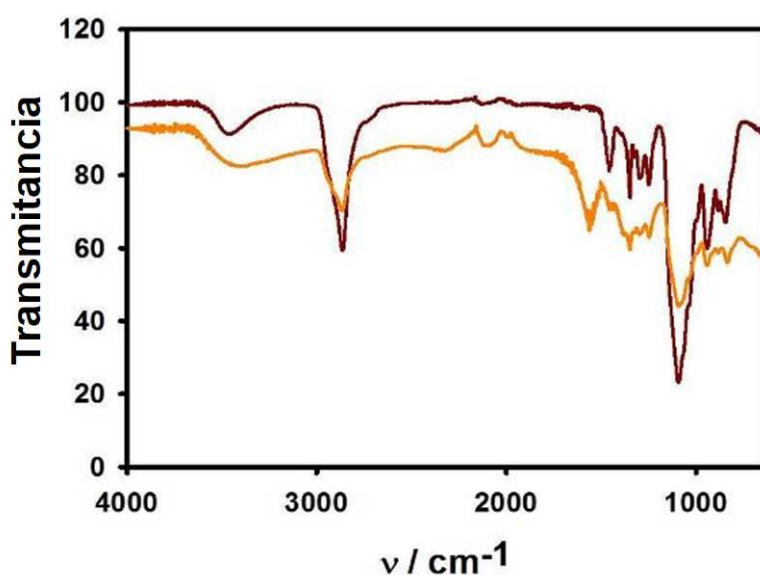


Figura 4.4: Espectros ATR-FTIR de: (a) PEG (marrón), NP3 (naranja).

Los espectros FTIR de PEG y de las NP3 que pueden observarse en la Figura 4.4 muestran la presencia de bandas de absorción características de PEG debidas al estiramiento antisimétrico de C-O-C a 1.348 cm^{-1} , a las vibraciones C-O-C que se encuentran a 1.090 cm^{-1} y a las vibraciones fuera de plano del -CH a 943 cm^{-1} para PEG y 947 cm^{-1} para NP3. La banda a 1.250 cm^{-1} en el espectro del PEG, que corresponde a la torsión de los grupos CH_2 , se desplaza a 1.245 cm^{-1} para las NP3. La banda alrededor de 2.868 cm^{-1} asignada a las vibraciones de $-\text{CH}_2$ en el espectro de PEG, se desplaza a 2.864 cm^{-1} en NP3. Se informaron corrimientos similares de estas bandas para PEG unido a nanopartículas de TiO_2 (12).

Medidas de incremento de temperatura

Para poder evaluar el efecto fototérmico que podrían tener los nanoplatos, suspensiones acuosas de las distintas nanopartículas ($A^{800} = 0.10$) y un blanco de agua ultra pura, fueron irradiadas con un láser pulsado Ti: Zafiro de femtosegundo operando a $\lambda = 800$ nm (0.6 W), en un sistema prácticamente adiabático preparado manualmente. Se midió el incremento de la temperatura en función del tiempo y los resultados se muestran en la Figura 4.5. Como puede observarse, a cada tiempo de irradiación se obtuvieron mayores temperaturas para las suspensiones de nanopartículas comparadas con el agua pura, en concordancia con el efecto fototérmico esperado.

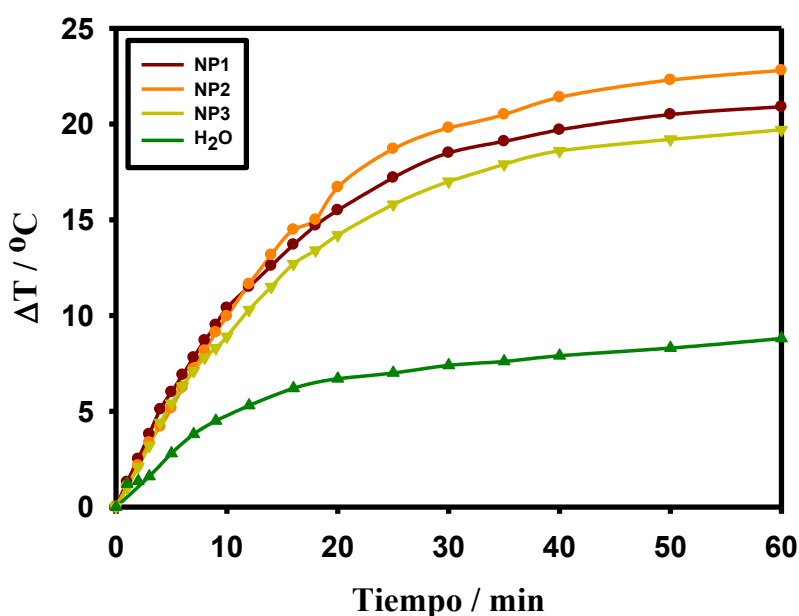


Figura 4.5: Incremento de la Temperatura luego de la irradiación a 800 nm.

Ensayos de Optoacústica

Los ensayos optoacústicos inducidos por láser (13), permiten medir la fracción de energía liberada al medio como calor instantáneo por irradiación de las suspensiones de las nanopartículas.

Pang et al. (14), estudiaron las señales optoacústicas generadas en suspensiones de nanopartículas de oro y encontraron que las amplitudes de las señales generadas en las suspensiones de las partículas, eran superiores a las producidas por soluciones de la misma absorbancia a la longitud de onda de irradiación de un colorante utilizado como referencia calorimétrica. Esta diferencia, fue explicada mediante la contribución de la expansión termoelástica de las nanopartículas de oro a la señal optoacústica (14).

La Figura 4.6 muestra las señales optoacústicas, normalizadas con la energía del láser, para:

- La referencia calorimétrica utilizada: CuSO_4 (13).
- Suspensiones de los 3 tipos de nanoplatos, con absorbancias coincidentes a la longitud de onda de excitación: 800 nm.

La absorbancia de todas las muestras a 800 nm fue de 0.25. El coeficiente de absorción molar del CuSO_4 a 800 nm es $10.57 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Es decir que la concentración de sulfato de cobre fue de 0.024 M. La concentración de nanopartículas fue de 53 μM para NP1, 28 μM para NP2 y 22 μM para NP3.

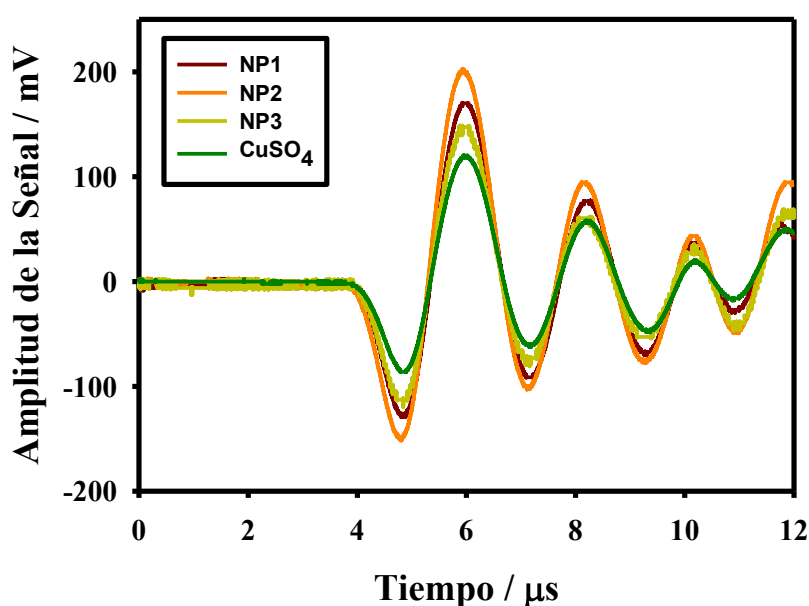


Figura 4.6: Señales de optoacústica obtenidas a 25°C para suspensiones acuosas de las nanopartículas y el CuSO_4 con igual absorbancia (0.25 ± 0.02) a 800 nm (170 mW.cm^{-2}).

Como se observa en la Figura 4.6, nuestros resultados, muestran señales optoacústicas de mayor intensidad para las muestras de las tres nanopartículas de plata, en comparación con la referencia calorimétrica, lo que está en completo acuerdo con los resultados obtenidos por Pang et al. para nanopartículas de oro y en consecuencia este comportamiento también podría asignarse la contribución de la expansión termoelástica de las nanopartículas metálicas a la señal optoacústica.

Debemos tener en cuenta que los resultados de la Figura 4.6 son preliminares y para poder afirmar la señal optoacústica en parte a la expansión termoelástica de los nanoplatos metálicos es necesario la realización de experimentos de optoacústica en función de la temperatura(15).

Medidas de Fosforescencia de Oxígeno singlete

Como se explicó en la introducción, la literatura sugiere que solo las nanopartículas que tienen la superficie de Ag (111), como son los nanoplatos sintetizados y caracterizados en este trabajo, tienen la capacidad de fotosensibilizar la producción de $O_2(^1\Delta g)$ (5).

Por eso mismo se procedió a realizar medidas de fosforescencia de oxígeno singlete de los tres tipos de nanopartículas, para ver si, al presentar los nanoplatos superficies de plata del tipo (111), eran capaces de generar oxígeno singlete al ser irradiados con un láser de 670 nm.

La figura 4.7 muestra las medidas de intensidad de fosforescencia de oxígeno singlete para una ftalocianina de aluminio (AlPcS₄) utilizada como referencia, y los tres tipos de nanopartículas.

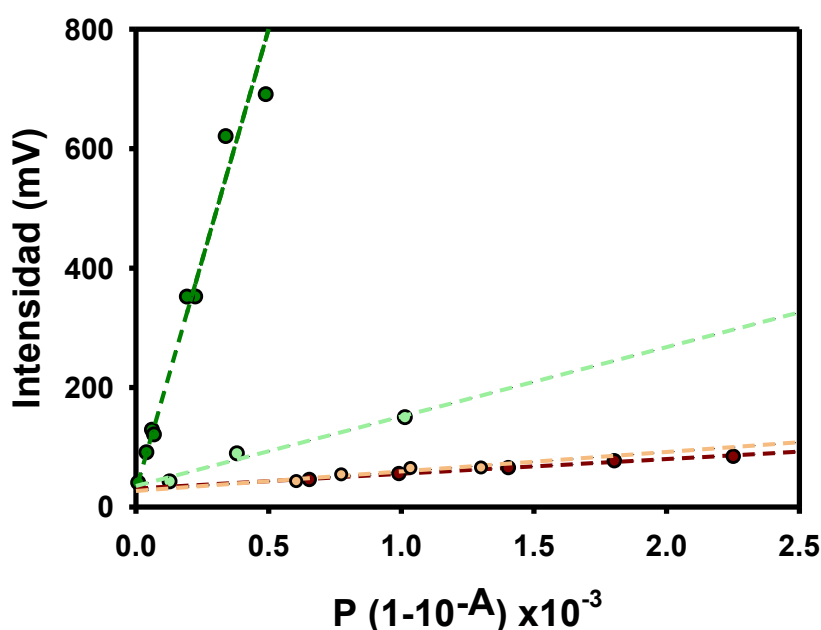


Figura 4.7: Medidas de intensidad de fosforescencia de oxígeno singlete a 1280 nm en función de distintas potencias del láser(P): AlPcS₄ (verde oscuro), NP1 (marrón), NP2 (naranja) y NP3 (verde claro). El factor $(1-10^{-A})$ representa la fracción de energía absorbida por las muestras y corrige por pequeñas diferencias en las absorbancias entre las distintas muestras.

La AlPcS₄ fue tomada como referencia, ya que su rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) es bastante conocido e igual a 0.38 (16). A partir de ella pudo calcularse el rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete de cada

nanoplate por comparación de las pendientes de los gráficos de la intensidad de la señal de fosforescencia en función de la potencia del láser para las muestras y la referencia (17). Los resultados se muestran en la Tabla 4.1.

	Pendiente/ Pendiente AlPcS_4	Φ_{Δ}
AlPcS_4	1	0.38 (15)
NP1	0.016	0.006
NP2	0.021	0.008
NP3	0.075	0.03

Tabla 4.1: Tiempos de vida de oxígeno singlete, relación de pendientes y rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete. Los tiempos de decaimiento de las señales fueron de $4 \pm 2 \mu\text{s}$ (18).

Como se ve reflejado en los resultados, las nanopartículas presentan una muy baja generación de oxígeno singlete.

Conclusiones Parciales

- Se lograron sintetizar y caracterizar tres tipos de nanopartículas de plata con distintos polímeros estabilizantes: dos con PVP y una con PEG.
- Las suspensiones de las tres nanopartículas presentan alta absorción en las zonas donde los tejidos biológicos presentan menor absorción.
- Se encontró una característica muy interesante en este tipo de partículas, una gran cantidad de fallas de apilamiento en dirección $\langle 111 \rangle$, es decir, paralelas a las caras $\{111\}$.
- El aumento de temperatura de las nanopartículas fue significativamente mayor que el del agua al ser irradiadas con un láser a 800 nm.
- En resultados preliminares se observaron mayores señales de optoacústica para las nanopartículas en comparación con el CuSO_4 (referencia calorimétrica), lo que se le atribuye a la contribución de la expansión termoelástica de las nanopartículas metálicas a la señal optoacústica.
- Los tres tipos de nanopartículas son capaces de generar oxígeno singlete con muy bajos rendimientos cuánticos.

Bibliografía

1. Shanmugam V, Selvakumar S, Yeh C-S. Near-infrared light-responsive nanomaterials in cancer therapeutics. *Chem Soc Rev*. 2014; 43(17):6254–6287.
2. Duque JS, Blandón JS, Riascos H. Localized Plasmon resonance in metal nanoparticles using Mie theory. *J Phys Conf Ser*. 2017;850(1).
3. Zharov VP, Galitovsky V, Viegas M. Photothermal detection of local thermal effects during selective nanophotothermolysis. *Appl Phys Lett*. 2003; 83(24): 4897–4899.
4. Boca SC, Potara M, Gabudean AM, Juhem A, Baldeck PL, Astilean S. Chitosan-coated triangular silver nanoparticles as a novel class of biocompatible, highly effective photothermal transducers for in vitro cancer cell therapy. *Cancer Lett*. 2011; 311(2):131–140.
5. Vankayala R, Sagadevan A, Vijayaraghavan P, Kuo CL, Hwang KC. Metal nanoparticles sensitize the formation of singlet oxygen. *Angew Chemie - Int Ed*. 2011; 50(45): 10640–10644.
6. Zhang Q, Li N, Goebel J, Lu Z, Yin Y. Article A Systematic Study of the Synthesis of Silver Nanoplates : Is Citrate a " Magic " Reagent ? *J Am Chem Soc*. 2011; 133:18931–18939.
7. Wang R, Zhang F. NIR luminescent nanomaterials for biomedical imaging. *J Mater Chem B*. 2014; 2(17):2422.
8. Aherne D, Ledwith DM, Gara M, Kelly JM. Optical Properties and Growth Aspects of Silver Nanoprisms Produced by a Highly Reproducible and Rapid Synthesis at Room Temperature. *Adv Funct Mater*. 2008; 18(14):2005–2016.
9. Banholzer MJ, Harris N, Millstone JE, Schatz GC, Mirkin CA. Abnormally Large Plasmonic Shifts in Silica-Protected Gold Triangular Nanoprisms. *J Phys Chem C*. 2010; 114(16):7521–7526.
10. Wang M, Song Y, Wang M, Zhang X, Wu J, Zhang T. Investigation on the role of the molecular weight of polyvinyl pyrrolidone in the shape control of high-yield silver nanospheres and nanowires. *Nanoscale Res Lett*. 2014; 9:17:1–8.
11. Gao Y, Jiang P, Liu DF, Yuan HJ, Yan XQ, Zhou ZP, Wang JX, Song L, Liu LF, Zhou WY, Wang G, Wang CY, Xie SS. Evidence for the Monolayer Assembly of Poly(vinylpyrrolidone) on the Surfaces of Silver Nanowires. *J Phys Chem B*. 2004; 108(34): 12877–12881.
12. Venkatasubbu GD, Ramasamy S, Reddy GP, Kumar J. In vitro and in vivo anticancer activity of surface modified paclitaxel attached hydroxyapatite and titanium dioxide nanoparticles. *Biomed Microdevices*. 2013; 15(4):711–726.

13. Braslavsky SE, Heibel GE. Time-Resolved Photothermal and Photoacoustic Methods Applied to Photoinduced Processes in Solution. *Chem Rev.* 1992; 92(6):1381–1410.
14. Pang GA, Laufer J, Niessner R, Haisch C. Photoacoustic Signal Generation in Gold Nanospheres in Aqueous Solution: Signal Generation Enhancement and Particle Diameter Effects. *J Phys Chem C.* 2016; 120(48):27646–27656.
15. Brusa MA, Churio MS, Grela MA, Bertolotti SG, Previtali CM. Reaction volume and reaction enthalpy upon aqueous peroxodisulfate dissociation: $S_2O_8^{2-} \rightarrow 2SO_4^{\cdot-}$. *Phys Chem Chem Phys.* 2000; 2: 2383-2387.
16. Fernandez JM, Bilgin MD, Grossweiner LI. Singlet oxygen generation by photodynamic agents. *J Photochem Photobiol B Biol.* 1997; 37: 131-140.
17. Carlos L, Cipollone M, Soria DB, Sergio Moreno M, Ogilby PR, García Einschlag FS, Martire DO. The effect of humic acid binding to magnetite nanoparticles on the photogeneration of reactive oxygen species. *Sep Purif Technol.* 2012; 91:23-29.
18. Ogilby PR. Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chem Soc Rev.* 2010; 39(8):3181.

Capítulo 5

Capítulo 5 Aplicación de los Nanoplatos de Plata en PTT.

“No importa cuánto avance la medicina. Hay dolores que solo se quitan con un abrazo, una charla o durmiendo un ratito”

Rafael Cabaliere

Como se explicó anteriormente, en los últimos años se ha prestado gran atención a las nanopartículas metálicas para ser utilizadas en PTT, ya que pueden generar un aumento de temperatura localizado al ser irradiadas con luz de longitud de onda que coincida con su pico en el LSPR (1).

Si se lograra irradiar estas nanopartículas cuando se encuentran dentro del tumor, se minimizarían los efectos secundarios del tratamiento, ya que no se necesitarían grandes energías de irradiación y se minimizaría el daño a los tejidos sanos localizados alrededor del tejido maligno (2,3). Estos efectos indeseados también se minimizarían utilizando láseres de longitudes de onda comprendidas dentro de la región del infrarrojo cercano (NIR), zona del espectro donde los tejidos biológicos presentan menor absorción.

Es importante destacar que estudios en los que se utilizaron nanopartículas de oro como agentes en la terapia fototérmica, demostraron que la muerte celular por efecto fototérmico, es generada principalmente mediante el proceso de necrosis; a su vez, si se observa muerte celular por apoptosis, la transición de apoptosis temprana a tardía suele ser más rápida (4). Otros autores afirman que la muerte celular sea por necrosis o apoptosis, depende principalmente del grado en el que se logre aumentar la temperatura (5). Zhang et al., hablan además de un tercer tipo de muerte celular que puede producir el tratamiento fototérmico, que se conoce como necroptosis, que consiste en una forma programada de necrosis o muerte celular inflamatoria (6).

Teniendo en cuenta esto, y habiendo logrado sintetizar y caracterizar tres tipos de nanopartículas que presentan alta absorción en las zonas donde se encuentran las ventanas biológicas, se procedió a realizar ensayos en células HeLa para evaluar la capacidad de estas tres nanopartículas de ser utilizadas en PTT. Las técnicas elegidas en este caso fueron la microscopía confocal de disco giratorio y la microscopía de tiempos de vida de fluorescencia (FLIM).

Con el fin de medir el efecto fototérmico intracelular de nuestras nanopartículas, se incubaron células HeLa con los nanoplatos y un colorante con emisión dependiente de la temperatura para que pueda ser capaz de actuar como un termómetro óptico intracelular. Decidimos usar la Rodamina B (RhB) ya que encontramos que su rendimiento cuántico de fluorescencia, Φ_F , aumenta en un factor de 2 cuando la temperatura varía entre la temperatura ambiente y 200 K. El cambio correspondiente de su tiempo de vida de fluorescencia, τ , es consistente con la relación $k_F = \Phi_F \times \tau$, donde k_F es la constante de decaimiento radiativo (7,8). La fluorescencia de RhB es además prácticamente independiente del pH por encima de 6 (9). Por último encontramos que la RhB se distribuye a través de membranas biológicas donde se ha utilizado como sonda mitocondrial (10). Debido a estas propiedades, se la utilizó con éxito como termómetro óptico para medir la temperatura en muestras de tendones de rata expuestas a campos

electromagnéticos de radiofrecuencia (11) y en células expuestas a continuas microondas y láseres pulsados (12,13).

Ensayos de MTT y RN

Como primera medida, se decidió probar la viabilidad de células HeLa tanto en presencia de los nanomateriales como de RhB, para poder elegir las concentraciones que se utilizarán luego en el resto de los ensayos biológicos. Para este propósito, se emplearon las pruebas ya explicadas con anterioridad, de reducción de MTT y de captación de Rojo Neutro, las cuales determinan la capacidad mitocondrial y lisosomal de las células, respectivamente (14,15).

Como puede verse en la Figura 5.1, la incorporación de RhB a una concentración en el medio de cultivo de 3.5 μM mostró una viabilidad disminuida, mientras que para concentraciones menores o iguales a 2 μM la viabilidad celular permanece inalterada. Para las nanopartículas en cambio, hasta una concentración 10 μM (en Ag) en el medio de cultivo, la viabilidad celular no se vio afectada.

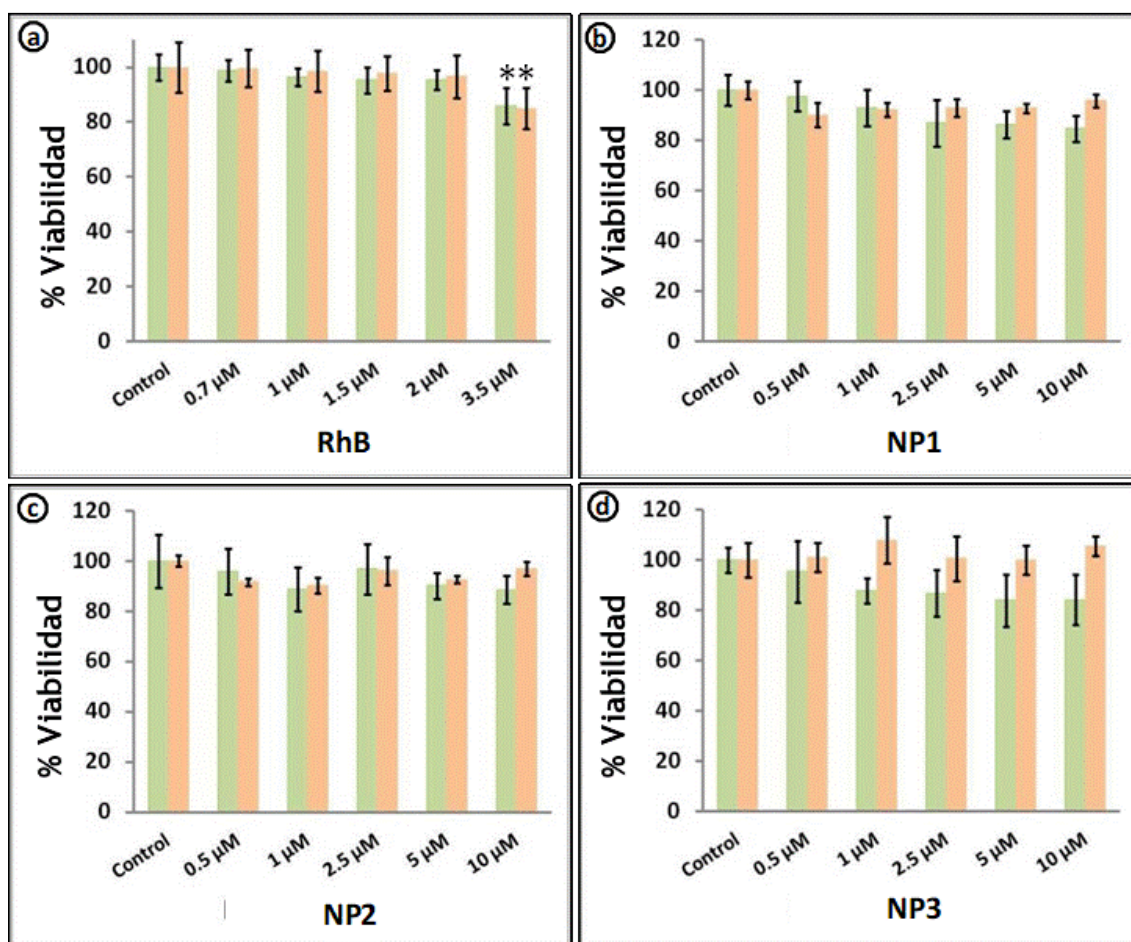


Figura 5. 1: Histogramas que muestran los resultados de los ensayos MTT (verde) y RN (naranja) en células HeLa incubadas con diferentes concentraciones de RhB (a), NP1 (b), NP2 (c) y NP3 (d), presentes en el medio. Los valores de absorbancia de formazan y rojo neutro se normalizaron frente a valores promedio obtenidos con células a las que no se habían agregado ni RhB ni partículas (control). Las barras de error se refieren a una desviación estándar; en cada caso, el número de muestras examinadas fue entre 4 y 6. Las diferencias significativas se representan con * según test ANOVA con la prueba de Tukey, $p < 0.05$.

Debido a estos resultados, se decidió que todos los ensayos biológicos posteriores se realizaran con concentraciones de RhB $\leq 2.5 \mu\text{M}$ y de nanopartículas $\leq 10 \mu\text{M}$.

Ensayos de Anexina V/ IP

Como se explicó anteriormente, la Anexina V, se usa junto con yoduro de propidio (PI), para evaluar si las células son viables, apoptóticas o necróticas, a través de las diferencias en la integridad y permeabilidad de la membrana plasmática (16–19).

Para estos ensayos, las células HeLa se incubaron durante 24 h con las suspensiones $10 \mu\text{M}$ de las distintas nanopartículas. Luego se incubaron con Anexina V

/ PI durante 15 min, y finalmente se expusieron a una irradiación de 11 minutos de duración con un láser de 640 nm acoplado al microscopio confocal.

Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron usando un divisor de haz óptico para medir simultáneamente los canales con longitudes de onda de excitación de 488 nm (21 μ W) y 561 nm (40 μ W), empleados para las pruebas de Anexina V y PI, respectivamente. Los resultados se resumen en la Tabla 5.1.

	Control (60 min)	NP1 (35 min)	NP2 (35 min)	NP3 (35 min)
Anexina V	-	+	-	-
PI	-	+	-	-

Tabla 5. 1: Resultados de los ensayos de Anexina V/PI. El tiempo transcurrido después de la irradiación se indica entre paréntesis.

Estos resultados indican que la incubación de las células HeLa con las suspensiones de NP1, seguida de una irradiación a 640 nm, condujo claramente a un fotodaño relacionado tanto con la apoptosis temprana como con la apoptosis tardía o necrosis.

Se detectaron menores efectos de fotodaño cuando las células se incubaron con suspensiones NP2 o NP3 antes de la irradiación.

Ensayos de co-localización de la RhB

Las células de mamífero que son transfectadas con vectores de expresión Dendra2-mito, muestran una señal con emisión verde localizada en las mitocondrias y distribuida uniformemente dentro de las 10-12 h posteriores a la transfección (20).

Dado que RhB se utilizará como termómetro óptico para probar el efecto fototérmico de nuestras nanopartículas, se realizaron experimentos comparativos de imágenes de fluorescencia empleando células HeLa transfectadas con la sonda mitocondrial Dendra2-mito, e incubadas con una solución de RhB 0.125 μ M durante 10 min, para determinar la localización de este colorante dentro de las células HeLa.

Las imágenes de fluorescencia obtenidas empleando los canales de 488 nm (3,15 μ W) y 561 nm (137 μ W) para la excitación de Dendra2-mito y RhB respectivamente, se

muestran en la Figura 5.2. Estos resultados muestran claramente que la RhB se localiza en las mitocondrias.

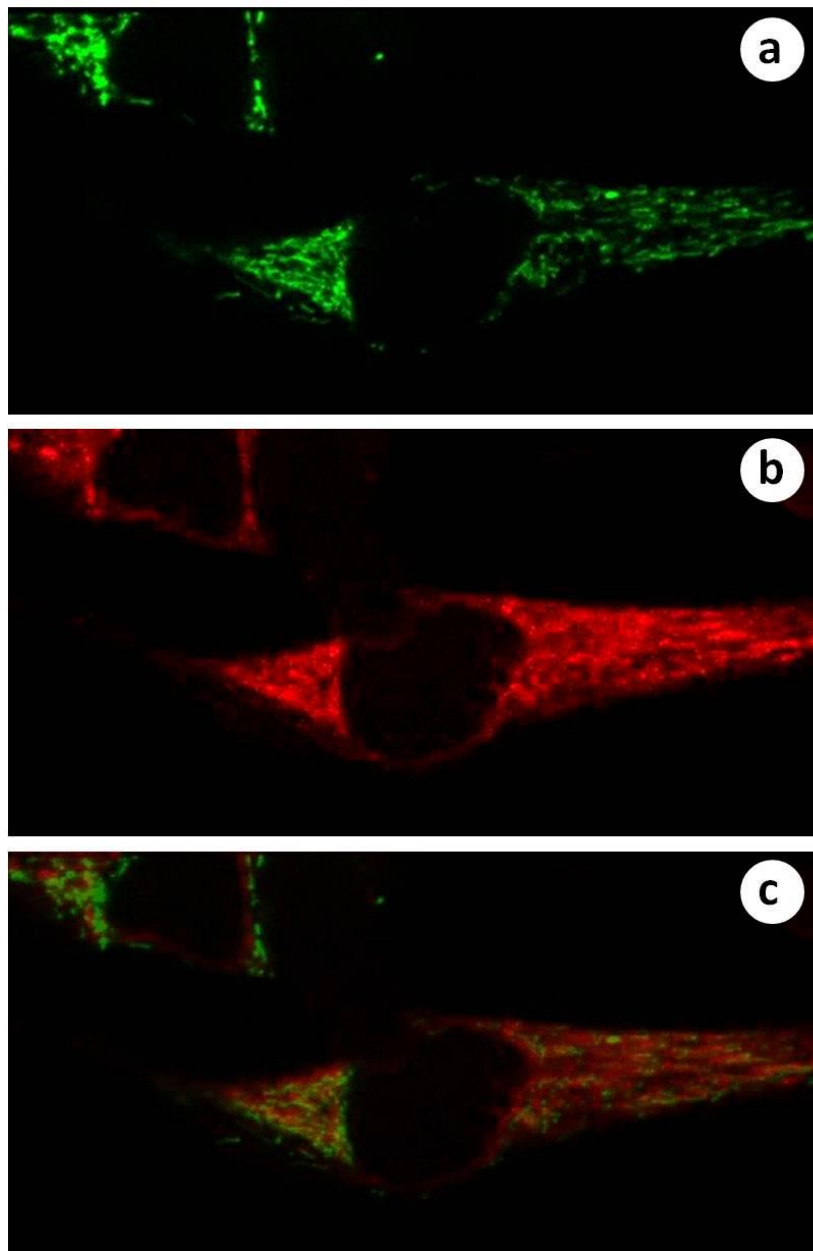


Figura 5. 2: imágenes de fluorescencia de células HeLa transfectadas con Dendra2-mito: (a) sin incubar e (b) incubadas con RhB; (c) superposición de las imágenes a y b.

Evaluación de la RhB como termómetro óptico intracelular

Se llevaron a cabo experimentos para evaluar la capacidad de la fluorescencia RhB para detectar cambios de temperatura en el interior de las células HeLa utilizando la Microscopía confocal de disco giratorio. La Figura 5.3 y la Tabla 5.2 muestran respectivamente los resultados obtenidos para imágenes de fluorescencia y la intensidad de fluorescencia integrada para una misma área de evaluación, al variar la temperatura de 25°C a 37°C.

Los resultados demuestran sin duda la disminución de la intensidad de fluorescencia RhB en células HeLa al calentar desde 25°C hasta 37°C, indicando que el colorante puede ser usado como un termómetro óptico intracelular en las células HeLa.

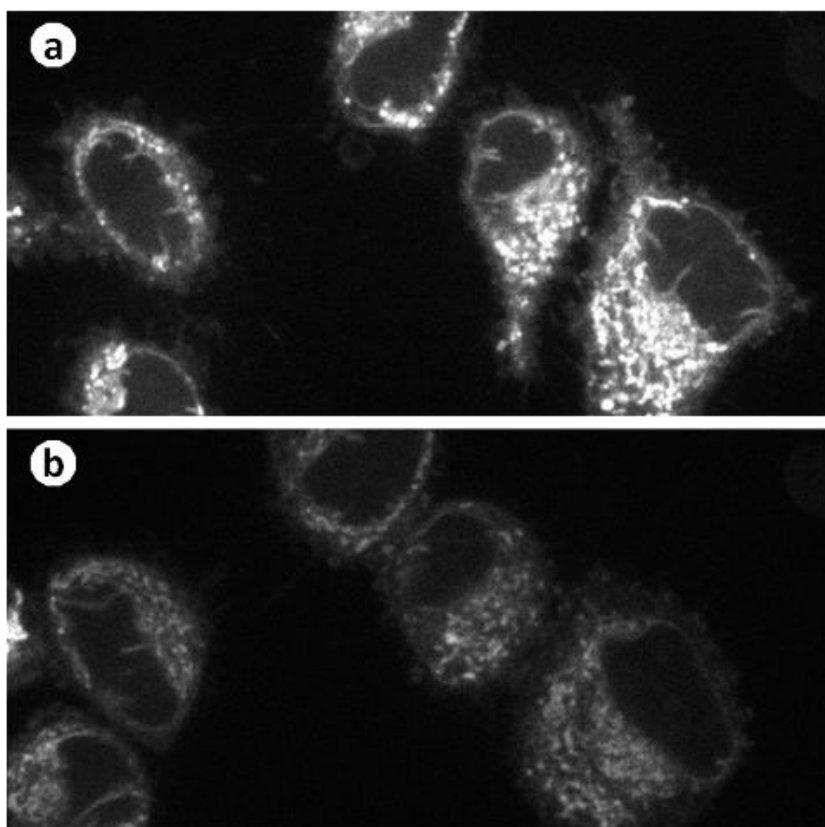


Figura 5. 3: Imágenes de fluorescencia de células HeLa incubadas con 2.5 μ M de RhB durante 30 min, para las mismas células obtenidas a 25°C (a) y 37°C (b).

Temperatura	Media	Desviación Estandar
25°C	16546	6080
37°C	6328	1824

Tabla 5. 2: Intensidad de fluorescencia integrada en una misma área de evaluación correspondiente a un sector de la Figura 5. 3.

Ensayos similares fueron realizados con células HeLa incubadas durante 24 h con NP1 10 μ M, seguida de una incubación de 30 min con RhB 2.5 μ M. Los resultados obtenidos, mostrados en la Figura 5.4 y la Tabla 5.3, también confirman que la fluorescencia de RhB puede detectar los cambios de temperatura en presencia de las nanopartículas en células HeLa en las cuales se varió su temperatura de desde 25°C a 37°C. Esto significa que la incubación con los nanoplatos no afecta la posibilidad de utilizar RhB como termómetro óptico.

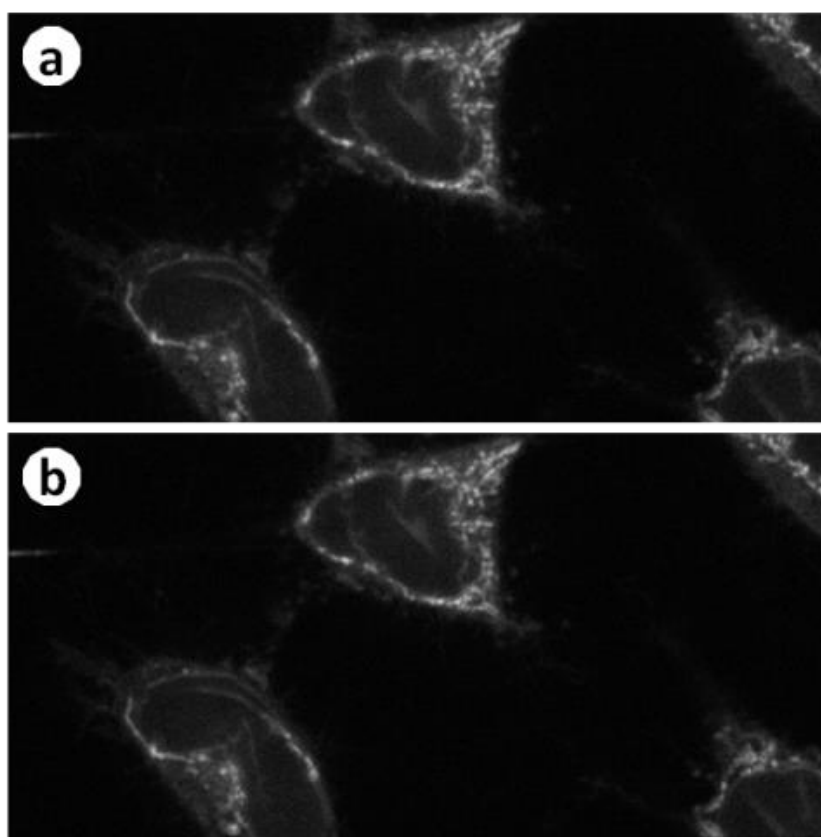


Figura 5. 4: Efecto de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia de células HeLa incubadas con NP1 y RhB. Imágenes de fluorescencia de las mismas células obtenidas a 25 °C (a) y 37 °C (b).

Temperatura	Media	Desviación Estándar
25°C	11703	4418
37°C	7736	2985

Tabla 5. 3: Intensidad de fluorescencia integrada en una misma área de evaluación correspondiente a la Figura 5. 4.

Por último, se realizaron experimentos con el objetivo de verificar que la disminución de la intensidad de fluorescencia se deba a la disminución del tiempo de vida de fluorescencia de la RhB, y no al blanqueamiento (“bleaching”) del colorante debido a la radiación absorbida durante el experimento. En estos experimentos se realizaron medidas similares a las anteriores, en células HeLa incubadas el mismo tiempo con las mismas concentraciones de NP1 y de RhB, pero esta vez enfriando las células desde 37°C hasta 26.6°C. Los resultados se muestran en la Figura 5.5 y la Tabla 5.4.

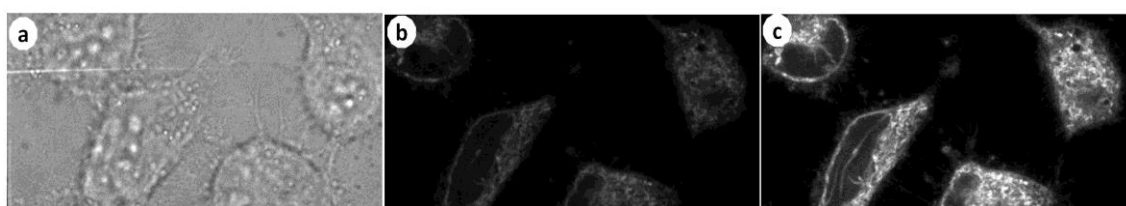


Figura 5. 5: Efecto de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia de las células HeLa incubadas con NP1 y RhB. (a) Imagen de campo claro de las células empleadas en los experimentos de fluorescencia. Imágenes de fluorescencia obtenidas a 37°C (b) y 26.6°C (c).

Temperatura	Media	Desviación Estándar
37°C	3963	974
26.6 °C	10690	2916

Tabla 5. 4: La tabla muestra la intensidad de fluorescencia integrada en la misma área de evaluación que en Figura 5.5.

Como se ve reflejado en los resultados, el efecto observado de disminución en la intensidad de fluorescencia se debe a los cambios en los tiempos de vida de la fluorescencia del colorante por efecto de la temperatura, y no al posible blanqueamiento del colorante.

Por último, se realizaron experimentos de medida de intensidad de fluorescencia a 25°C, con células HeLa incubadas con 10 μM de NP1 durante 24 h, seguido de la incubación con RhB 2.5 μM por 30 min, luego de irradiar las mismas con el láser de 640 (585 μW) nm. Los resultados presentados en la Figura 5.6 y en la Tabla 5.5, respaldan el efecto fototérmico de las NP1 y la posibilidad de su detección empleando RhB como termómetro óptico.

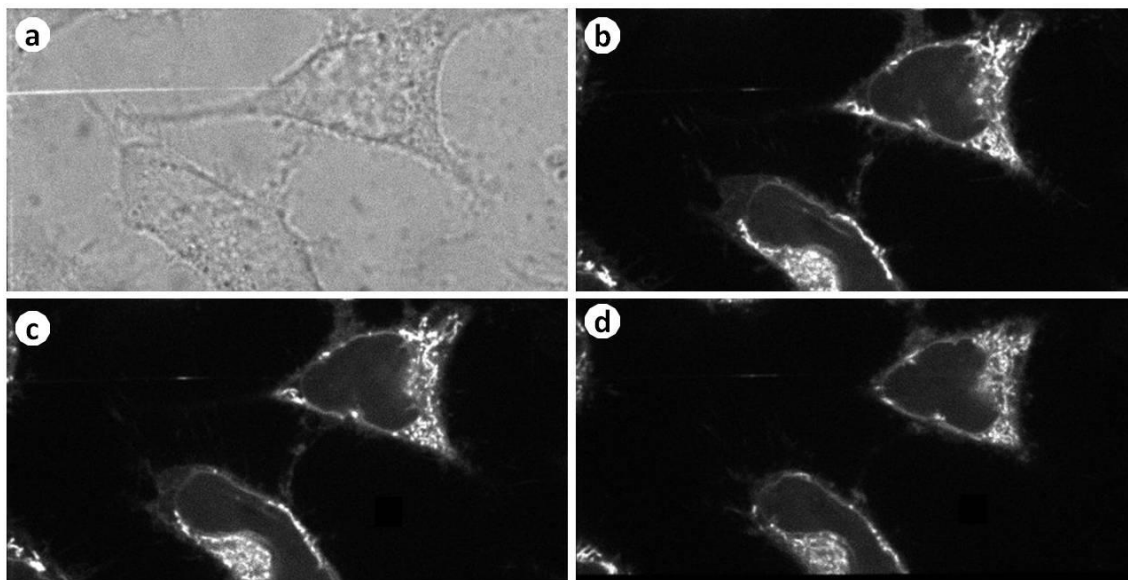


Figura 5. 6: Efecto de irradiación de 640 nm sobre la intensidad de fluorescencia de las células HeLa incubadas con y RhB. (a) Imagen de campo claro de las células empleadas en los experimentos de fluorescencia. Imágenes de fluorescencia obtenidas: antes (b), después de 1 minuto (c), y 6 minutos (d) irradiación de 640 nm.

Tratamiento	Media	Desviación Estándar
Antes de irradiar	16438	4204
640 nm por 1min	15527	3496
640 nm por 6 min	12616	2931

Tabla 5. 5: La tabla muestra la intensidad de fluorescencia integrada en la misma área de evaluación que en Figura 5.6.

Se realizaron además ensayos control con células HeLa incubadas solo con el colorante durante 30 min a una concentración en el medio de cultivo de 2.5 μM . Los resultados presentados en la Figura 5.7 y Tabla 5.6 no muestran una disminución de la intensidad de fluorescencia tras la irradiación con el láser de 640 nm (585 μW), esto reafirma la hipótesis de que las nanopartículas son las encargadas de generar el aumento de temperatura cuando las células son irradiadas a 640 nm.

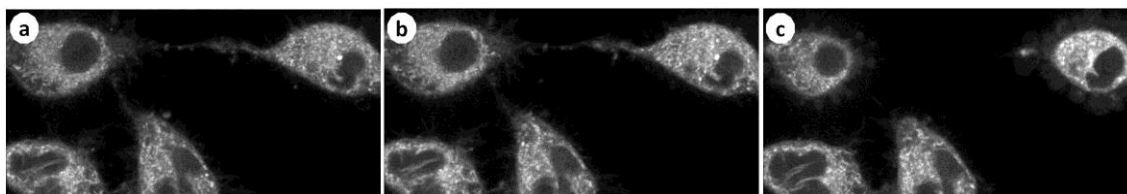


Figura 5. 7: Efecto de irradiación a 640 nm sobre la intensidad de fluorescencia de células HeLa incubadas con RhB. Imágenes de fluorescencia obtenidas: antes (a), después de 1 min (b) y 6 min (c) de irradiación a 640 nm.

Tratamiento	Media	Desviación Estándar
Antes de irradiar	12562	2320
640 nm por 1min	13858	2490
640 nm por 6 min	15711	3199

Tabla 5. 6: La tabla muestra la intensidad de fluorescencia integrada en la misma área de evaluación que en la figura 5.7.

Experimentos de microscopía de tiempos de vida de fluorescencia (FLIM)

Los experimentos de FLIM, que permiten la detección de tiempos de vida de fluorescencia de imágenes de células individuales, fueron realizados utilizando células HeLa incubadas con RhB y/o las nanopartículas de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 1) Se adquirieron imágenes de varias células de un área amplia con el láser de excitación de 880 nm (16,6 mW).
- 2) Se obtuvieron imágenes de algunas células de un área más pequeña con excitación a 780 nm (17,35 mW).
- 3) Se repitió el paso 1 para comparar imágenes de células irradiadas y no irradiadas a 780 nm.
- 4) En algunos casos, se adquirieron las imágenes de tiempos de vida de fluorescencia de un área más grande que las empleadas en los pasos 1 y 3, con fines comparativos.

El tiempo de irradiación en cada paso fue 80 s.

Las Figuras 5.8, 5.9 y 5.10, muestran las imágenes de tiempos de vida de fluorescencia obtenidas para células HeLa incubadas con 10 μ M de NP1 (6 h), NP2 (8h) o NP3 (10h) respectivamente, seguidas de una incubación de 30 min con RhB 2.5 μ M, medidas de acuerdo con el protocolo anterior. La Figura 5.11 muestra las imágenes de tiempo de vida de fluorescencia obtenidas de células HeLa incubadas solo con el colorante.

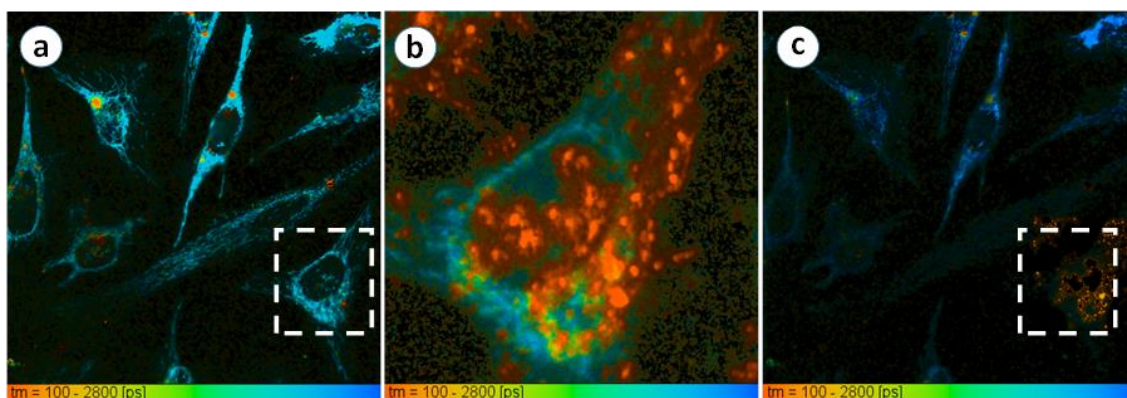


Figura 5. 8: Imágenes de FLIM de células HeLa incubadas con NP1 y RhB: obtenidas con excitación de 880 nm y zoom 3 (a). El área marcada en blanco corresponde a la imagen completa mostrada en (b) obtenida con excitación a 780 nm y zoom 10. La imagen (c) se obtuvo con excitación a 880 nm y zoom 3 después de registrar la imagen (b).

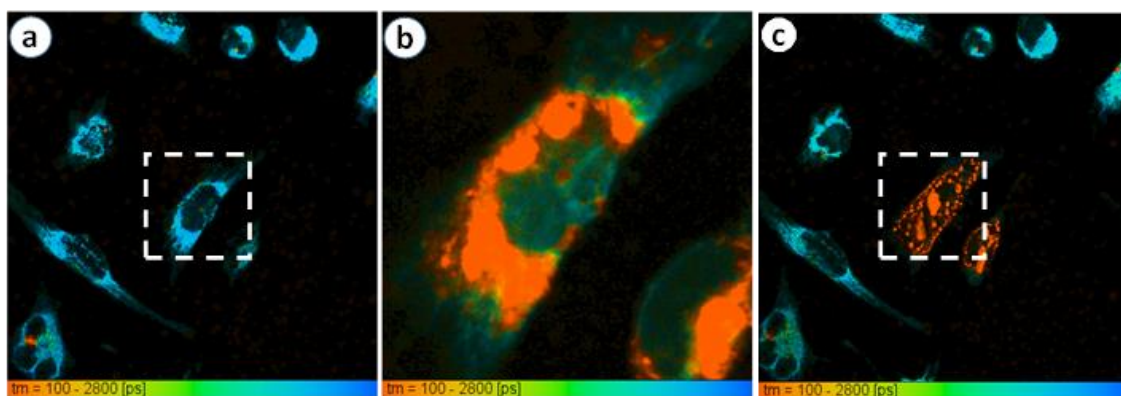


Figura 5. 9: Imágenes de FLIM de células HeLa incubadas con NP2 y RhB: obtenidas con excitación a 880 nm y zoom 3 (a). El área marcada en blanco corresponde a la imagen completa mostrada en (b) obtenida con excitación a 780 nm y zoom 10. La imagen (c) se obtuvo con excitación a 880 nm y zoom 3 después de registrar la imagen (b).

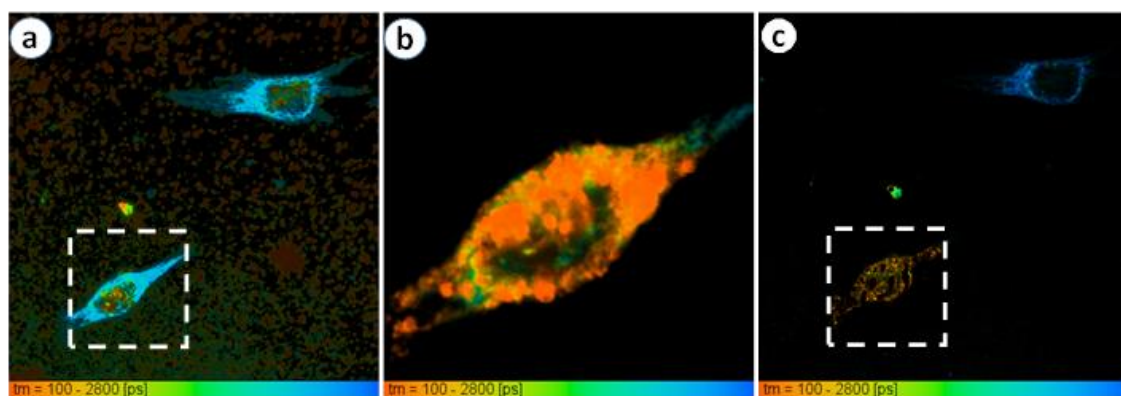


Figura 5. 10: Imágenes FLIM de células HeLa incubadas con NP3 y RhB: obtenidas con excitación a 880 nm y zoom 3 (a). El área marcada en blanco corresponde a la imagen completa mostrada en (b) obtenida con excitación a 780 nm y zoom 10. La imagen (c) se obtuvo con excitación a 880 nm y zoom 3 después de registrar la imagen (b).

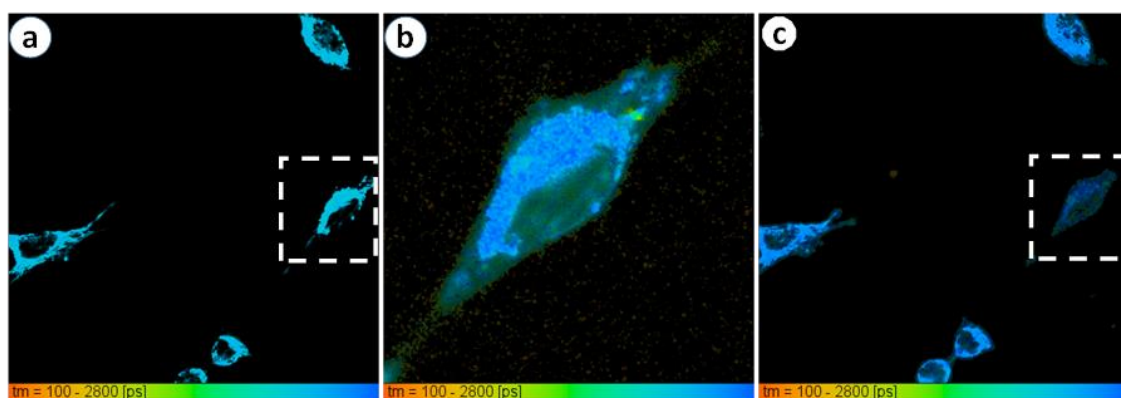


Figura 5. 11: Imágenes de FLIM de células HeLa incubadas con RhB: obtenidas con excitación a 880 nm y zoom 3 (a). El área marcada en blanco corresponde a la imagen completa mostrada en (b) obtenida con excitación a 780 nm y zoom 10. La imagen (c) se obtuvo con excitación a 880 nm y zoom 3 después de registrar la imagen (b).

Los resultados muestran claramente que luego de la irradiación de 780 nm, las células HeLa previamente incubadas con cualquiera de las tres nanopartículas, presentan ciertas “manchas” rojas o áreas que corresponden a una emisión de tiempo de vida de fluorescencia corto (<1 ns). Además, se observa una disminución de los tiempos de vida de fluorescencia en las áreas verdes cercanas a las rojas.

Esta última observación se asigna al acortamiento del tiempo de vida de fluorescencia de la RhB. Sin embargo, las áreas rojas no emergen tras la irradiación de células HeLa incubadas solo con el colorante (Figura 5.11). Esto nos lleva a concluir, que la emisión de tiempos de vida cortos que aparecen luego de la irradiación a 780 nm sería una respuesta de las células al fototratamiento solamente cuando son incubadas con las nanopartículas y el colorante.

Aunque hemos demostrado que existe un efecto fototérmico por excitación NIR tanto de las suspensiones de los nanoplatos, como de las células HeLa incubadas con los mismos, la generación de la especie de tiempo de vida de corta duración observada en los experimentos FLIM, podría ser el resultado del daño producido como consecuencia de la producción de oxígeno singlete formado por las nanopartículas, como se demostró en el capítulo anterior.

Por lo tanto, decidimos realizar los experimentos de FLIM en células incubadas con NaN_3 (inhibidor de la producción de oxígeno singlete) (21). La Figura 5.12 muestra que la irradiación de células HeLa a 780 nm, incubadas con NP2, RhB y NaN_3 , no impide la

generación de las áreas rojas correspondientes a los tiempos de vida cortos. Este resultado indica que el efecto de NaN_3 no es completamente protector, lo que respalda aún más la participación de un mecanismo fototérmico como responsable del fotodaño generado en las células. Cabe señalar que la concentración de azida de sodio utilizada en los ensayos celulares, no resulta tóxica para las células HeLa (22).

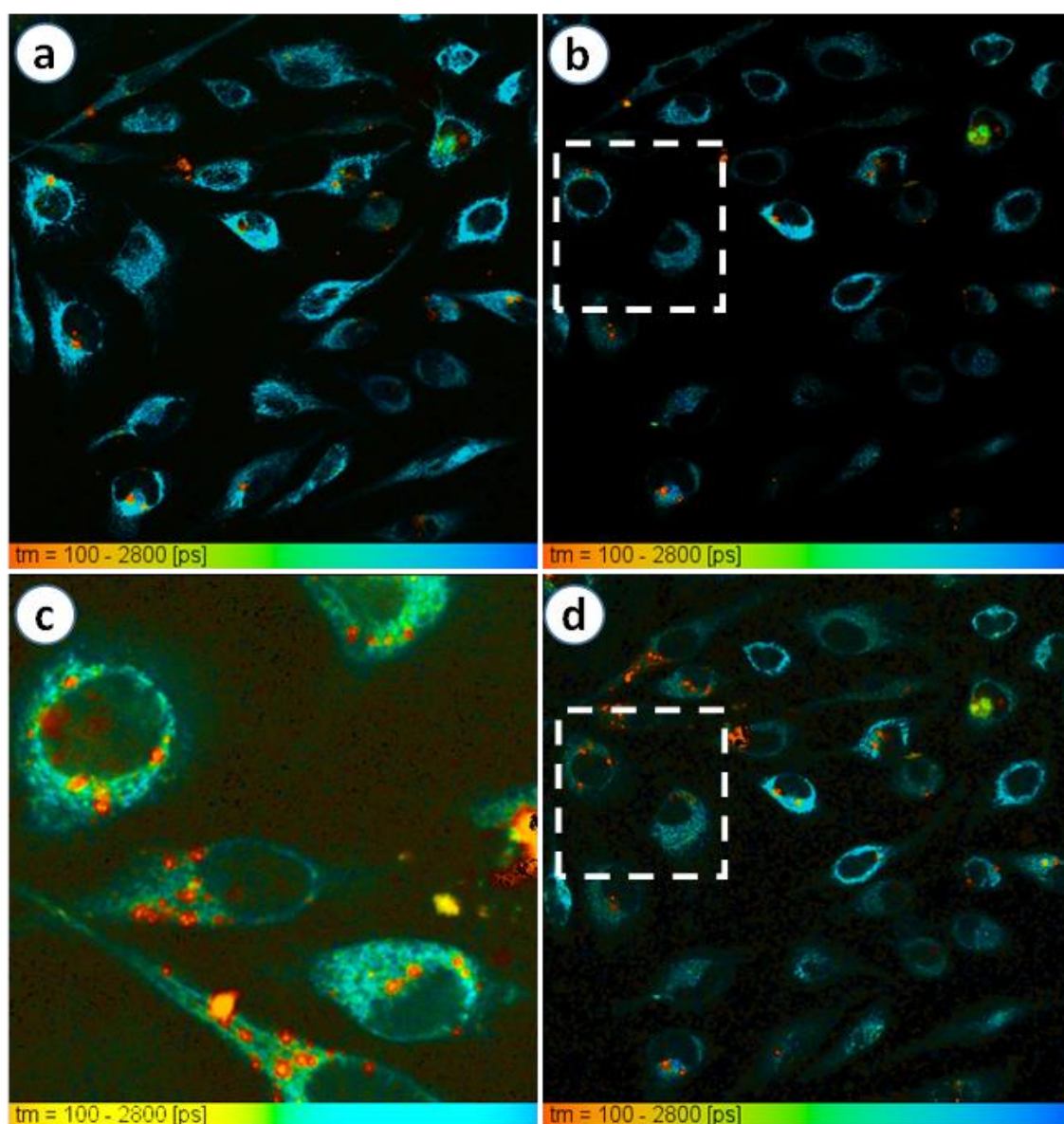


Figura 5. 12: Imágenes de vida de fluorescencia de células HeLa incubadas con 10 μM NP2 (24 h) y 0,5 RhB μM (30 min) antes (a) y después (b), (c) y (d) la adición de 0,5 mM de NaN_3 (10 min). Las imágenes (a) y (b) se obtuvieron con 880 nm de excitación y zoom 2. El área marcada en blanco corresponde a toda la imagen mostrada en (c) obtenida con 780 nm de excitación y zoom 6. La imagen (d) se obtuvo con excitación a 880 nm y zoom 2 después de grabar la imagen (c).

Finalmente, con el objetivo de evaluar si la presencia tanto del colorante como de los nanoplatos es necesaria para la aparición de la emisión con tiempos de vida cortos, se realizaron experimentos de FLIM con células HeLa incubadas solo con las nanopartículas. En estos ensayos, se registran los tiempos de vida de fluorescencia intrínsecos de las células HeLa. Los resultados se presentan en las figuras 5.13, 5.14 y 5.15. Nótese que la intensidad de emisión en estas imágenes es mucho menor que las obtenidas con células incubadas con RhB.

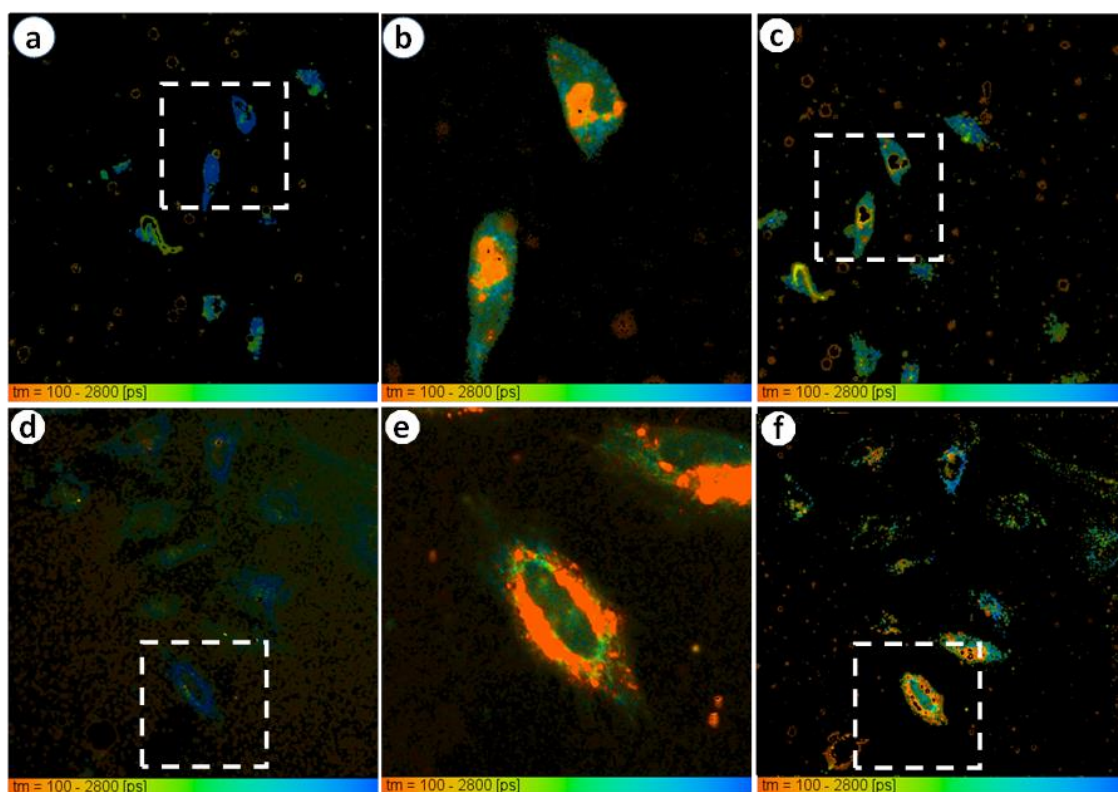


Figura 5. 13: Imágenes de vida de fluorescencia de células HeLa incubadas con 10 μ M de NP1 (24 h). Se muestran dos secuencias de irradiación de diferentes células. Las imágenes (a) y (d) se obtuvieron con excitación a 880 nm y zoom 2. El área marcada en blanco corresponde a las imágenes completas que se muestran en (b) y (e) para la primera y segunda secuencia, respectivamente. Estas imágenes se obtuvieron con excitación a 780 nm y zoom 6. Las imágenes (c) y (f) se obtuvieron con excitación a 880 nm y zoom 2 después de grabar las imágenes (b) y (e), respectivamente.

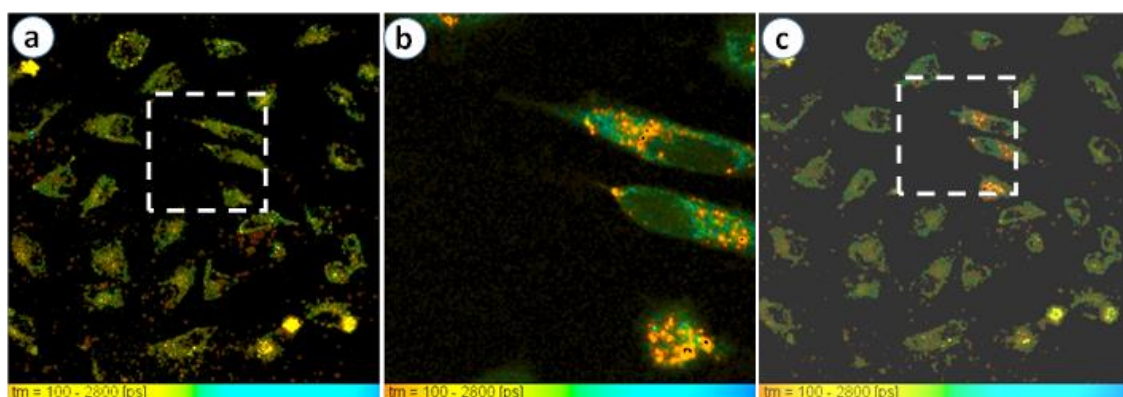


Figura 5. 14: Imágenes de vida de fluorescencia de células HeLa incubadas con 10 μ M de NP2 (24 h). La imagen (a) se obtuvo con excitación a 880 nm y zoom 2. El área marcada en blanco corresponde a la imagen completa que se muestran en (b). Estas imágenes se obtuvieron con excitación a 780 nm y zoom 6. La imagen (c) se obtuvo con excitación a 880 nm y zoom 2 después de grabar la imagen (b).

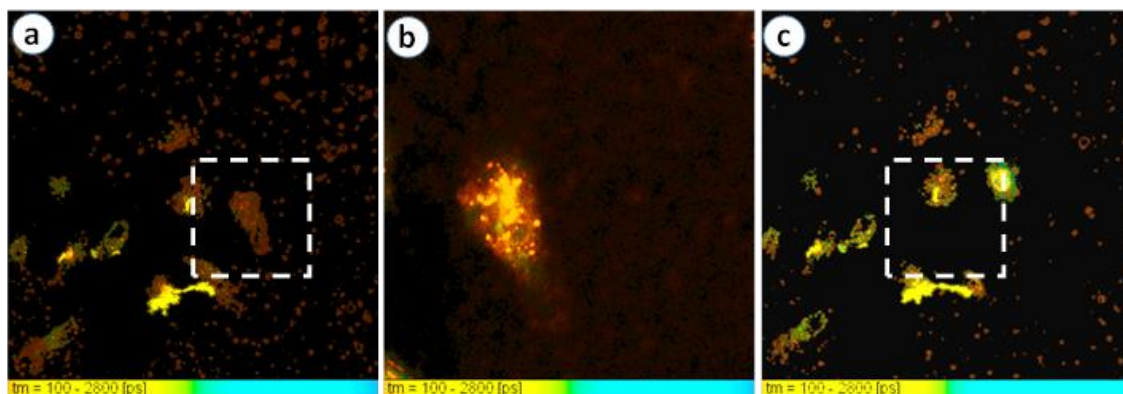


Figura 5. 15: Imágenes de vida de fluorescencia de células HeLa incubadas con 10 μ M de NP3 (24 h). La imagen (a) se obtuvo con una excitación de 880 nm y zoom 2. El área marcada en blanco corresponde a la imagen completa que se muestra en (b). Estas imágenes se obtuvieron con excitación a 780 nm y zoom 6. La imagen (c) se obtuvo con excitación de 880 nm y zoom 2 después de registrar la imagen (b).

Estos resultados muestran que las áreas rojas asociadas con fluorescencia de tiempos de vida corto también aparecen tras la irradiación de las células HeLa incubadas solo con los nanoplatos, respectivamente. Por lo tanto, concluimos que la presencia de RhB no es necesaria para el daño.

De todos los resultados obtenidos de las medidas de FLIM queda claro que las áreas observadas con tiempos de vida de fluorescencia cortos se deben a una respuesta bioquímica de las células previamente incubadas con las nanopartículas y sometidas a irradiación NIR.

Estudios de fluorescencia resuelta en el tiempo de líneas celulares de melanoma murinas, metastásicas y no metastásicas, así como cáncer de pulmón y células epiteliales bronquiales humanas, mostraron que la vida media de los fluoróforos endógenos del dinucleótido nicotinamida y adenina (NADH), era menor en células metastásicas que en células no metastásicas (23).

Awasthi et al. (24), investigaron las imágenes de tiempo de vida de fluorescencia intracelular de NADH y el dinucleótido de flavina y adenina (FAD), de células de fibroblastos normales de rata (WFB) y de células de cáncer obtenidas por transfección de un oncogén H-ras en las WFB (W31). Estos autores descubrieron que el tiempo de vida medio de la autofluorescencia de NADH y FAD era más corto en las células cancerosas que en las células normales, debido a la diferencia en la unión entre las proteínas y NADH o FAD en los diferentes entornos intracelulares de las células normales y cancerosas.

Lakowicz et al. (25) obtuvieron los valores de tiempo de vida de fluorescencia del NADH no unido (libre en solución) y NADH unido a la enzima malato deshidrogenasa, para revelar diferencias en los tiempos de vida del estado excitado de las dos especies. Medidas de FLIM de NADH libre y unido a proteínas en células endoteliales cultivadas de aorta de ternera, mostraron cambios en los valores de tiempo de vida de 0.4 a 0.5 y 2.0 a 2.5 ns para moléculas libres y unidas, respectivamente (23).

Liang et al. (26) encontraron que células hepáticas expuestas a paracetamol en comparación con células no expuestas mostraron tiempos de vida de fluorescencia de NADH más bajos.

Estos resultados indicarían que una posible explicación de la aparición de los tiempos de vida cortos observados en nuestros experimentos, podría estar relacionada con el efecto que la terapia fototérmica podría desencadenar sobre la unión del NADH a proteínas celulares.

Kannadaraï et al. (27) irradiaron con láser NIR células de carcinoma renal humano incubadas con nanovarillas de oro, e informaron una disminución drástica de la autofluorescencia del NADH y FAD medidos inmediatamente después del tratamiento, en comparación con el grupo de control. Estos autores asignaron la disminución en la intensidad de fluorescencia de las células tratadas a la alteración en el estado redox de las células.

Su et al. (28) irradiaron células de carcinoma de pulmón incubadas previamente con ácido 5-aminolevínico para realizar experimentos de PDT empleando diversas dosis de luz. Estos autores demostraron que el efecto de PDT sobre la vida de fluorescencia de NADH era dosis dependiente, y que se observó una mejora del tiempo de vida de fluorescencia del NADH cuando las células morían por apoptosis, mientras que se percibía un acortamiento en los tiempos de vida cuando las células morían por necrosis.

Conclusiones Parciales

- La incorporación de los nanoplatos en concentraciones hasta 10 μ M en Ag en el medio de cultivo de las células HeLa no tiene un efecto adverso sobre la viabilidad celular.
- Los ensayos de Anexina V/IP mostraron que la incubación de las células HeLa con las suspensiones de NP1, seguida de una irradiación a 640 nm, condujo claramente a un fotodaño relacionado tanto con la apoptosis temprana como con la apoptosis tardía o necrosis. Los efectos del fotodaño fueron menores cuando las células se incubaron con suspensiones NP2 o NP3 antes de la irradiación.
- Los ensayos de co-localización muestran claramente que la RhB se localiza en las mitocondrias.
- Las imágenes de Microscopía confocal de disco giratorio de las células HeLa incubadas con Rodamina B y las nanopartículas, tomadas a diferentes temperaturas, muestran que el colorante puede emplearse como un termómetro óptico intracelular en las condiciones de trabajo utilizadas.
- La microscopía de imagen de tiempos de vida de fluorescencia (FLIM), mostró que después de la irradiación NIR de las células HeLa incubadas con las nanopartículas en presencia o ausencia de RhB, estas generan una respuesta al fotodaño, visualizada por la formación de áreas (manchas) rojas correspondientes a tiempos de vida de fluorescencia <1 ns. Investigando la literatura, la emisión de corta duración se asigna a la fluorescencia NADH.
- Un acortamiento del tiempo de vida de fluorescencia en las áreas cercanas a las manchas podría deberse a RhB, cuyo tiempo de vida de fluorescencia depende de la temperatura.

Bibliografía

1. Huang X, El-Sayed MA. Plasmonic photo-thermal therapy (PPTT). Alexandria Journal of Medicine. 2011; 47(1):1–9.
2. Abadeer NS, Murphy CJ. Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles. Journal of Physical Chemistry C. 2016; 120(9):4691–4716.
3. Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. Lasers in Medical Science. 2008; 23(3):217–228.
4. He Y, Hsiao JH, Yu JH, Tseng PH, Hua WH, Low MC, et al. Cancer cell death pathways caused by photothermal and photodynamic effects through gold nanoring induced surface plasmon resonance. Nanotechnology. IOP Publishing; 2017; 28(27):275101.
5. Zhang Y, Zhan X, Xiong J, Peng S, Huang W, Joshi R, Cai Y, Liu Y, Li R, Yuan K, Zhou N, Min W. Temperature-dependent cell death patterns induced by functionalized gold nanoparticle photothermal therapy in melanoma cells. Scientific Reports. 2018; 8(1):1–9.
6. Wu W, Liu P, Li J. Necroptosis: An emerging form of programmed cell death. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2012; 82(3):249-258.
7. Karstens T, Kobs K. Rhodamine-B and Rhodamine-101 As Reference Substances for Fluorescence Quantum Yield Measurements. The Journal of Physical Chemistry. 1980; 84:1871–1872.
8. Kubin RF, Fletcher AN. Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes. Journal of Luminescence. 1982; 27(4):455–62.
9. Shah JJ, Sundaresan SG, Geist J, Reyes DR, Booth JC, Rao M V, et al. Microwave dielectric heating of fluids in an integrated microfluidic device. Journal of Micromechanics and Microengineering. 2007; 17(11):2224–2230.
10. Reungpatthanaphong P, Dechsupa S, Meesungnoen J, Loetchutinat C, Mankhetkorn S. Rhodamine B as a mitochondrial probe for measurement and monitoring of mitochondrial membrane potential in drug-sensitive and -resistant cells. Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 2003; 57(1):1–16.
11. Chen YY, Wood AW. Application of a temperature-dependent fluorescent dye (Rhodamine B) to the measurement of radiofrequency radiation-induced temperature changes in biological samples. Bioelectromagnetics. 2009; 30(7):583–590.
12. Kohler S, O'Connor RP, Vu TDT, Leveque P, Arnaud-Cormos D. Experimental microdosimetry techniques for biological cells exposed to nanosecond pulsed electric fields using microfluorimetry. IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques. 2013; 61(5):2015–2022.

13. Moreau D, Lefort C, Burke R, Leveque P, O'Connor RP. Rhodamine B as an optical thermometer in cells focally exposed to infrared laser light or nanosecond pulsed electric fields. *Biomedical Optics Express*. 2015; 6(10):4105–4117.
14. Twentyman PR, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British Journal of Cancer*. 1987; 56(3):279–285.
15. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. *Nature Protocols*. 2008; 3(7):1125–1131.
16. Is&m, Vermes, a, *, Clemens, Haanen, et al. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine early apoptotic cells using fluorescein labelled expression on Annexin V. *ournal of Immunological Methods* . 1995; 184(95):39–51.
17. Palma PFR, Baggio GL, Spada C, Silva RD a, Ferreira SI a CP, Treitinger A. Evaluation of annexin V and Calcein-AM as markers of mononuclear cell apoptosis during human immunodeficiency virus infection. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2008; 12:108–114.
18. Hingorani R, Deng J, Elia J, McIntyre C, Mittar D. Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVersTM System. *BD Biosciences*. 2011; August(August):1–12.
19. Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *Journal of Visualized Experiments*. 2011; (50):3–6.
20. Pham AH, Mccaffery JM, Chan DC. Mouse lines with photo-activatable mitochondria to study mitochondrial dynamics. *Genesis*. 2012; 50(11):833-843.
21. Rubio MA, Mártire DO, Braslavsky SE, Lissi EA. Influence of the ionic strength on O₂ (¹Δg) quenching by azide. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*. 1992; 66(2).
22. Bosio GN, Breitenbach T, Parisi J, Reigosa M, Blaikie FH, Pedersen BW, Silva EFF, Martire DO, Ogilby PR.. Antioxidant β-carotene does not quench singlet oxygen in mammalian cells. *Journal of the American Chemical Society*. 2013; 135(1):272–279.
23. Bird DK, Yan L, Vrotsos KM, Eliceiri KW, Vaughan EM, Keely PJ, White JG, Ramanujam N.. Metabolic mapping of MCF10A human breast cells via multiphoton fluorescence lifetime imaging of the coenzyme NADH. *Cancer Research*. 2005; 65(19):8766–8773.
24. Awasthi K, Moriya D, Nakabayashi T, Li L, Ohta N. Sensitive detection of intracellular environment of normal and cancer cells by autofluorescence lifetime imaging. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Elsevier B.V.; 2016; 165:256–265.

25. Lakowicz JR, Szmacinski H, Nowaczyk K, Johnson ML. Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992; 89(4):1271–1275.
26. Liang X, Wang H, Liu X, Roberts M. Quantitative optical imaging of paracetamol-induced metabolism changes in the liver. 2016; (December 2016):100131H.
27. Kannadorai RK, Giap G, Chiew Y, Luo KQ, Liu Q. Gold nanorods as photothermal agents and autofluorescence enhancer to track cell death during plasmonic photothermal therapy. 2015; 9537:1–6.
28. Su G-C, Wei Y-H, Wang H-W. NADH fluorescence as a photobiological metric in 5-aminolevulinic acid (ALA)-photodynamic therapy. *Optics Express*. 2011; 19(22):21145-21154.0

Capítulo 6

Capítulo 6 Conclusiones generales

“- Sombrero: ¿He perdido la razón?

-Alicia Kingsley: Me temo que sí. Estás completamente demente. Pero te diré un secreto. Las mejores personas lo están.”

Lewis Carrol

- Se demostró que las nanopartículas de plata estabilizadas con pectina forman un complejo con la riboflavina en estado basal. Al excitar a 355 o 400 nm, longitudes de onda donde absorben tanto la riboflavina libre como la complejada, se pueblan el estado singlete excitado de la riboflavina y el estado excitado del complejo, y desde ambos, se produce un cruce entre sistemas a los estados tripletes de riboflavina. De esta manera, en presencia de las nanopartículas, la población del estado triplete de riboflavina comienza a tiempos más cortos y alcanza concentraciones más elevadas. Esto tiene como consecuencia un aumento en la producción de oxígeno singlete y de radical anión superóxido, dando lugar este último a un incremento en la generación de peróxido de hidrógeno.
- Los resultados fotofísicos nos motivaron a investigar el efecto de las nanopartículas de plata estabilizadas con pectina sobre la terapia fotodinámica sensibilizada por riboflavina en células HeLa y demostramos un efecto fotodinámico mayor en presencia de las nanopartículas. La muerte celular en este caso se produjo mediante un mecanismo de apoptosis tardía o necrosis, en comparación con la muerte celular en células incubadas solo con riboflavina, donde el mecanismo es de apoptosis temprana.
- Se sintetizaron nanopartículas de oro estabilizadas con pectina. Por espectroscopía UV-visible no se obtuvo evidencia de la formación de un complejo entre la riboflavina y estas nanopartículas. Los ensayos de espectroscopía de absorción de transientes no mostraron un aumento en la producción de oxígeno singlete.
- Se sintetizaron 3 nanoplatos de plata diferentes con alta absorción en las zonas de las ventanas biológicas. El aumento de temperatura de las nanopartículas fue significativamente mayor que el del agua al ser irradiadas con un láser a 800 nm y además presentaron mayores señales de optoacústica en comparación con la referencia calorimétrica. Con estos resultados, decidimos probar si los nanoplatos eran útiles para su uso en terapia fototérmica. Mediante microscopía de imagen de tiempos de vida de fluorescencia (FLIM), demostramos que luego de la irradiación NIR de células HeLa incubadas con las nanopartículas, se genera una respuesta al fotodaño, visualizada por la formación de áreas rojas correspondientes a tiempos de vida de fluorescencia menores a 1 ns. Esta emisión de corta duración fue asignada a la fluorescencia del NADH, especie altamente producida por las células cuando están sometidas a diferentes situaciones de estrés.

- Se logró comprobar, por medio de microscopía confocal de disco giratorio, que la Rodamina B puede emplearse como un termómetro óptico intracelular.

